

G Meisenberg

München 1981

ZUM VORKOMMEN VERHALTENSAKTIVER PEPTIDE
BEI SÄUGETIEREN

Dissertation der
Fakultät für Biologie
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von

Gerhard Meisenberg
aus Dortmund

Juni 1981



1. Berichterstatter
Prof. Linzen
 2. Berichterstatter:
Priv. Doz. Dr. Raab
- Tag der mündl. Prüfung:
2.12.1981

Herrn Professor Dr. H. Jatzkewitz bin ich für
die mir großzügig gewährte Unterstützung und
Förderung zu größtem Dank verpflichtet.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555210_0008

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
I. Verhaltenstests	8
a) Der Schwimmtest	9
b) Der "Mäusekratztest"	11
c) Der Röhrentest	12
II. Wirkungen von Peptiden	13
1. Hormone des Hypophysenhinterlappens	13
a) Wirkungen im Schwimmtest	13
b) Wirkungen im Kratztest	13
c) Wirkungen im Röhrentest	19
2. Wirkungen anderer Peptide	21
a) Substanz P	23
b) Neurotensin	23
c) Bombesin	27
d) Apamin	29
III. Untersuchung von Extrakten	30
IV. Pharmakologische Charakterisierung der Wirkungen von Hinterlappenhormonen	42
1. Wirkungen nach subcutaner Injektion	42
2. Zeitabhängigkeit	43
3. Toleranzbildung	45
a) Experimente mit akuter Vorbehandlung (Tachyphylaxie)	45
b) Experimente mit chronischer Vorbehandlung	49
4. Interaktion mit pharmakologisch wirksamen Substanzen	54
V. Synthetische Analoga von Hinterlappenhormonen	60

1. Die Aktivitätseinheit	60
2. Struktur-Aktivitäts-Beziehungen	61
3. Die Analoga im Röhrentest	66
4. Antagonismus	69
5. Die Blut-Hirn-Schranke	69
VI. Artspezifität von Peptidwirkungen	72
Material und Methoden	77
1. Peptide	77
2. Pharmaka	77
3. Tiere	78
4. Extrakte	78
a) Ausgangsmaterial	78
b) Extraktionen	79
c) Reinigung auf Sephadex G-25 fine	79
d) Erste Präparation	79
e) Zweite Präparation	80
f) Endreinigung	80
g) Aminosäureanalyse und Aminosäuresequenz	81
5. Verteilungskoeffizienten	81
Diskussion	83
1. Die Methoden	83
2. Verhaltenseffekte bei Peptiden	84
3. Die Wirkungen der Hinterlappenhormone	85
4. Struktur-Aktivitäts-Beziehungen: Der Rezeptor	86
5. Physiologische Bedeutung der Verhaltens- effekte von Hinterlappenhormonen	87
6. Die Blut-Hirn-Schranke	89
7. Extrakte	91
Zusammenfassung	92
Literatur	95

Einleitung und Zielsetzung.

Seit der Strukturaufklärung der Hormone des Hypophysenhinterlappens durch du Vigneaud et al. im Jahre 1953 (154,155) finden die Neuropeptide wachsendes Interesse. Inzwischen wurde bei einer großen Zahl niedermolekularer Peptide eine Lokalisation innerhalb des Zentralnervensystems nachgewiesen. In sehr vielen Fällen handelt es sich hierbei um Peptide, die ursprünglich in Organen außerhalb des Gehirns, wie zum Beispiel in der Hypophyse oder im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen wurden und die außerhalb des Zentralnervensystems in physiologische Vorgänge eingreifen. In einigen Fällen wurde mit immunologischen Verfahren das Vorhandensein bestimmter Peptide im Gehirn gezeigt, ohne daß über die chemische Identität dieses "immunreaktiven Materials" endgültige Klarheit besteht (15,42,123). In mehreren Fällen wurden biologische Wirkungen, die in Gehirnextrakten nachgewiesen wurden, auf das Vorhandensein von strukturell nicht aufgeklärten Peptiden zurückgeführt (43,110,131). Es ist daher nicht möglich, die genaue Anzahl der bei höheren Wirbeltieren nachgewiesenen Neuropeptide anzugeben.

Abgesehen von Glutathion, das an grundlegenden Stoffwechselvorgängen beteiligt ist, sind die Konzentrationen der physiologisch aktiven Peptide im Gehirn äußerst niedrig. Sie liegen in den meisten Fällen erheblich niedriger als $1\mu\text{g}/\text{Gramm}$ Frischgewicht und damit unter den für Monoamine typischen Werten (33,42,123). Tabelle 1 gibt einen Überblick über die wichtigsten Peptide, die im Zentralnervensystem von Säugetieren nachgewiesen wurden. Die angeführten biologischen Wirkungen beziehen sich, soweit nicht anders angegeben, auf die Ergebnisse von Versuchen an Nagetieren.

T A B E L L E 1

Einige Neuropeptide und ihre zentralnervösen Wirkungen.

Peptid	hauptsächliches Vorkommen	zentralnervöse Wirkungen
Vasopressin, Oxytocin	Hypophysenhinterlappen, Hypothalamus (33,61)	EEG-Änderungen (9) Beeinflussung von Lernprozessen (170) Änderungen des Catecholaminsatzes (84)
MIF-1	Hypophysenhinterlappen, Hypothalamus (130)	DOPA-Potenzierung (69) Anti-Parkinson-Wirkung (26,40)
TRH	Hypothalamus, andere Gehirnregionen (124)	Tremor (25) DOPA-Potenzierung (69)
Somatostatin	Hypothalamus (124), Magen, Pankreas (130)	Reduktion der motorischen Aktivität, "barrel rotation" (25)
LHRH	circumventrikuläre Organe, Hypothalamus (124,130)	Barbiturat-Antagonismus, Induktion von Lordosis (118)
ACTH	Hypophysenvorderlappen, Gehirn (118)	Beeinflussung von Lernprozessen (8,47) Stimulierung von Putzverhalten (52) "explosive motor behavior" (70)
Neurotensin	Hypothalamus, Nucleus accumbens, Gastrointestinaltrakt (103)	Reduktion motorischer Aktivität, elektrophysiologische Wirkungen (103) Hypothermie, Analgesie (102)
Substanz P	Substantia nigra, Hypothalamus, Gastrointestinaltrakt (73,89)	Induktion von Putzverhalten (77) Depolarisation von Neuronen (83,112,145) Stimulation einer Adenylatcyclase (36)
Bombesin	Haut von Bombina bombina (3) Gehirn von Säugetieren ? (15)	Hypothermie (14,114) Induktion von Putzverhalten (78)
Angiotensin	Gehirn, Blut (118)	DOPA-Potenzierung (68) Erhöhung der Flüssigkeitsaufnahme, Blutdruckerhöhung (118)

T A B E L L E 1 (Fortsetzung)

Peptid	hauptsächliches Vorkommen	zentralnervöse Wirkungen
Met-Enkephalin	Basalganglien, Hypothalamus,	Änderungen des Catecholaminsatzes (1)
Leu-Enkephalin	Area praeoptica (118)	Beeinflussung von Lernprozessen (140) Analgesie (118)
α -Endorphin	Hypophyse,	Katalepsie, "wet dog shakes" (65,70)
β -Endorphin	Gehirn (118)	Beeinflussung von Lernprozessen (140)
γ -Endorphin		Analgesie (92), Hypothermie (65)
Cholecysto- kinin	Großhirnrinde, Hippocampus, Amygdala, Gastrointestinaltrakt (123)	Reduktion der Nahrungsaufnahme, Depolarisation von Neuronen (123)
Vasoactive intestinal polypeptide	Hypothalamus, Hippocampus, Großhirnrinde, Gastrointestinaltrakt (42)	Stimulierung einer Adenylatcyclase, Depolarisation corticaler Neurone (42)
Scotophobin	Gehirn (150)	Vermeidung von Dunkelheit (151) Steigerung motorischer Aktivität (171)

Die physiologische Bedeutung dieser Neuropeptide wird untersucht. In einigen Fällen, so bei Substanz P (66,89,109,145), konnte eine Funktion als Transmitter in spezifischen neuronalen Bahnen nachgewiesen oder zumindest wahrscheinlich gemacht werden. Bei vielen Neuropeptiden konnte die Speicherung in Nervenendigungen, Calcium-abhängige Freisetzung und elektrophysiologische Wirkungen an Neuronen nachgewiesen werden (42,83,103,104,112,113,123,124). Neurochemische Wirkungen, wie zum Beispiel Änderungen im cyclo-AMP-Gehalt (12,36,119) oder im biologischen Umsatz von Catecholaminen in

einzelnen Gehirnregionen (1,24,93,152,153), sind bei mehreren Neuropeptiden bekannt. Die Verteilung im Gehirn ist, soweit sie untersucht wurde, ungleichmäßig (33,42,73,103,123). Alle diese Befunde zeigen, daß die Neuropeptide im allgemeinen nicht als "Zufallsprodukte" anzusehen sind, sondern als physiologisch relevante Substanzen, die entweder als klassische Transmitter oder als "Neuromodulatoren" unter physiologischen Bedingungen die Tätigkeit des Zentralnervensystems beeinflussen.

Es stellt sich die Frage, an welchen Funktionen des Zentralnervensystems Neuropeptide beteiligt sind. Einer der Wege, die zu einer Klärung dieser Frage dienen können, ist die Untersuchung der biologischen Wirkungen, die nach der Applikation der Peptide zu beobachten sind. Tatsächlich ließen sich bei zahlreichen Neuropeptiden zentralnervös vermittelte physiologische Wirkungen nachweisen. Beispiele dafür sind zentralnervös ausgelöste Änderungen des Blutglucosespiegels (16) und der Konzentration einzelner Hormone im Blut (103). Derartige periphere Wirkungen zentralnervös applizierter Peptide können über die Hypophyse (28, 65,144) oder über das vegetative Nervensystem (16) vermittelt werden.

Mehrere Peptide beeinflussen die zentralnervöse Regulation der Körpertemperatur und die Reaktion auf Schmerzreize (92, 102,103). Bekannt sind die zahlreichen zentralnervösen Wirkungen der Endorphine, von denen die meisten, aber nicht alle (65,76,102) durch die Stimulierung von Opiatrezeptoren vermittelt werden. Neben der analgetischen Wirkung und Wirkungen auf den Hormonhaushalt (28,92) lassen sich durch diese Peptide Verhaltensänderungen auslösen (65,70,96,149), bei hoher Dosierung tritt ein kataleptischer Zustand ein (149).

Neben den Wirkungen auf Schmerzempfindlichkeit, Temperaturregulation und Hormonhaushalt ist eine Beeinflussung von

Lernvorgängen durch Neuropeptide nachgewiesen. Die Fähigkeit des Scotophobins, bei Versuchstieren Vermeidung von Dunkelheit zu induzieren, ist umstritten (150,151,166,171). Weniger spezifische Wirkungen auf Lernprozesse wurden außer bei den Endorphinen (140) vor allem bei ACTH- und MSH-ähnlichen Peptiden (8,47) und bei Oxytocin und Vasopressin (9,163,165) beschrieben. Im Tierversuch verzögern diese Peptide das Vergessen bedingter Vermeidereaktionen. Diese Wirkungen auf Lernprozesse wurden als Indiz für "psychotrope" Eigenschaften gewertet (162).

Im Falle von Vasopressin handelt es sich hierbei um Wirkungen, die von beträchtlicher physiologischer Bedeutung sind: Ratten, die auf Grund eines erblichen Defekts kein Vasopressin synthetisieren können (167) oder die mit Antikörpern gegen Vasopressin behandelt wurden (169) zeigen Störungen des Lernverhaltens. Die Beeinflussung der Toleranzbildung gegenüber Opiaten und Äthanol durch Vasopressin und verwandte Peptide (63,64,125) weist auf eine physiologische Verwandtschaft dieser Toleranzbildungen mit klassischen Konditionierungen hin.

Auch andere Wirkungen von Neuropeptiden auf das Verhalten von Versuchstieren wurden beschrieben. Hierzu gehören Wirkungen auf die motorische Aktivität (18,127,157,171), auf das Putzverhalten von Nagetieren (52,77,78,81) und andere spontan auftretende Verhaltensweisen (45,65,75,80,86).

Eine sorgfältige Unterscheidung ist notwendig zwischen zentralnervös ausgelösten Wirkungen von Neuropeptiden und den Wirkungen, die primär über periphere Organe vermittelt werden. In vielen Fällen konnten zentralnervöse Wirkungen nur nachgewiesen werden, wenn die Peptide direkt ins Gehirnparenchym oder in die Liquorräume injiziert wurden (29,103). Verhaltensänderungen, die nach systemischer Applikation von Peptiden auftreten, können auch indirekt über Wirkungen auf

das vegetative Nervensystem oder an anderen peripheren Organen vermittelt werden. Die Frage, inwieweit die Blut-Hirnschranke für niedermolekulare Peptide durchlässig ist, ist nach wie vor kontrovers (55,74,76,87).

In den Fällen, in denen es möglich ist, zentralnervöse Peptidwirkungen spezifisch zu antagonisieren, treten nur begrenzte Anomalien auf. Das bekannteste Beispiel hierfür ist die geringe zentralnervöse Wirksamkeit von Naloxon und anderen Opiatantagonisten, die die über Opiatrezeptoren vermittelten Endorphinwirkungen blockieren (91): Die Endorphine des Gehirns sind offensichtlich, ähnlich wie das zentralnervöse Vasopressin, nicht lebensnotwendig.

Besonderes Interesse finden die zentralnervösen Wirkungen von Neuropeptiden unter klinischen Gesichtspunkten. Eine Beteiligung von Endorphinen (6,7,56,71) und anderen Neuropeptiden (40,54,101,121,148) am Zustandekommen psychopathologischer Krankheitsbilder wurde oft diskutiert, aber bisher nicht nachgewiesen. ACTH-Fragmente (34,99,128) und Vasopressin (90,108) wurden bei der Behandlung von Gedächtnisstörungen, ein Vasopressinderivat bei der Entwöhnung Heroinsüchtiger (5) angewandt. Einige andere Neuropeptide, vor allem die hypothalamischen Hormone Thyreotropin-Freisetzungsfaktor (TRH) und MSH-inhibiting factor (MIF-1), die im intakten Tier wenig charakteristische Verhaltensänderungen auslösen (25,26), potenzieren bei Mäusen die Verhaltenseffekte von exogenem L-DOPA (68,69,115). Diese Wirkung gilt als typisch für die klinisch verwendeten Antidepressiva und Antiparkinsonmittel (40,41). Die klinische Wirksamkeit dieser Peptide erwies sich allerdings als gering, obwohl die Wirkung im DOPA-Potenzierungstest zum Teil stärker war als die der klassischen Antidepressiva und Antiparkinsonmittel (68,69,118). Diese Ergebnisse demonstrieren eine prinzipielle Schwierigkeit bei der Untersuchung "psychotroper" Wirkungen mit Hilfe von Tierversuchen: Da derartige Wirkungen im

Tierversuch nicht direkt nachweisbar sind, ist man auf indirekte Methoden angewiesen, die keine exakten Prognosen für die Wirkung beim Menschen zulassen. Tatsächlich verursachen viele sehr stark psychotrope Substanzen, zum Beispiel aus der Gruppe der Halluzinogene, in Tierversuchen keine oder nur sehr uncharakteristische Verhaltensänderungen (27).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Frage untersucht, ob einzelne Neuropeptide in Verhaltenstests wirksam sind, bei denen Stress-induzierte Immobilitätsreaktionen auftreten. Derartige Tests werden für die tierexperimentelle Untersuchung psychotroper Wirkungen verwendet, vor allem bei Psychostimulantien und Antidepressiva sind Wirkungen in diesen Tests zu erwarten (116,117). In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst mit intakten Tieren gearbeitet und auf die Untersuchung gelernten Verhaltens, Vorbehandlung mit Drogen und ähnliche Manipulationen verzichtet. Bei Peptiden, die in derartigen einfachen Verhaltenstests interessante Wirkungen zeigten, wurde das Spektrum der induzierten Verhaltensänderungen untersucht. Durch Vergleich mit den Wirkungen psychoaktiver Pharmaka sollten Hinweise auf psychotrope Wirkungsqualitäten erhalten werden. Bei den Hinterlappenhormonen Oxytocin und Vasopressin, die in den verwendeten Tests besonders starke und charakteristische Wirkungen auslösten, wurde versucht, durch eine nähere pharmakologische Charakterisierung dieser Wirkungen Hinweise auf den Wirkungsmechanismus und die physiologische Bedeutung dieser Wirkungen zu erhalten.

Es wurde versucht, die Frage zu klären, ob außer den bekannten, strukturell aufgeklärten Neuropeptiden weitere Peptide nachweisbar sind, die in den verwendeten Verhaltenstests Wirkungen zeigen. Hierzu wurden peptidhaltige Extrakte aus Gehirn und Hypophyse von Schweinen untersucht. Peptidwirkungen, die in diesen Extrakten nachweisbar waren, wurden mit den Wirkungen der bekannten Neuropeptide verglichen.

I. Verhaltenstests.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Verhaltenstests verwendet, die entweder aus der Literatur übernommen oder neu entwickelt wurden. Mit diesen Tests wurden Extrakte, Neuropeptide und synthetische Peptidanaloga untersucht.

Für die Versuche wurden 25-35g schwere männliche Albino-mäuse des Stammes CF1/W68 verwendet. Es wurden je 10 - 20 Tiere in Plastik Käfigen bei 22-23°C Umgebungstemperatur in einem 12 x 12 h hell-dunkel-Rhythmus gehalten. Die Versuche wurden in einem 18-20°C warmen Raum durchgeführt.

Die Peptidlösungen wurden mit einer Hamilton Mikrospritze unter leichter Äthernarkose intracerebroventrikulär injiziert. Das Material war dabei in 20µl 150mM NaCl gelöst, die Injektion wurde über einen Zeitraum von etwa 10 Sekunden durchgeführt. Die Injektionsstelle lag 1-2mm seitlich der Mittellinie auf einer Linie, die durch die vordere Basis des Ohransatzes ging (59). Bei dieser Injektionstechnik werden Beschädigungen größerer Blutgefäße und des Gehirnparenchyms weitgehend vermieden.

Die intracerebroventrikuläre Injektion erlaubt die Untersuchung zentralnervöser Wirkungen auch bei Peptiden, die nicht die Blut-Hirn-Schranke passieren. Eine ausreichende Verteilung des injizierten Materials im Gehirn wurde durch die Verwendung des relativ großen Injektionsvolumens von 20µl erreicht: Bei Verwendung von 1% Methylenblau war das injizierte Material nicht nur im Seitenventrikel, sondern auch in den anderen Abschnitten des Ventrikelsystems und im Subarachnoidalraum auf der Oberfläche der Großhirnhemisphären, des Kleinhirns und des Hirnstamms nachweisbar.

Die Verhaltenstests wurden 6 - 12 Minuten nach der Injektion durchgeführt. Dieser Zeitraum wurde gewählt, um einerseits die Nachwirkungen der Äthernarkose abklingen zu lassen und andererseits dem biologischen Abbau der Peptide zuvorzukommen: Viele biologisch aktive Peptide werden in vivo sehr schnell proteolytisch abgebaut (94).

Im einzelnen wurden folgende Verhaltenstests verwendet:

a) Der Schwimmtest.

Die Maus wurde 6 Minuten nach der Injektion in einen Glaszylinder, 6,5cm breit und 20cm hoch, gesetzt, der mit Wasser von 21 - 23°C halb gefüllt war. Nach einer Phase heftiger Aktivität, in der die Mäuse versuchen, an der Wand des Gefäßes hochzuklettern ("Fluchtverhalten"), zeigen die Tiere zunehmend Perioden, in denen praktisch keine grobmotorische Aktivität zu beobachten ist ("Immobilität"): Die Maus treibt passiv auf dem Wasser. 2-6 Minuten nachdem die Maus ins Wasser gesetzt wurde, wurden Immobilität und Fluchtversuche kumulativ in Sekunden pro 4 Minuten gemessen.

Dieser Test ist in der Literatur als Screeningtest für Antidepressiva beschrieben: Psychostimulantien und die klinisch verwendeten Antidepressiva verursachen eine Verminderung der Immobilitätsphasen (116,117). Er wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet, um Peptide zu identifizieren, die in Tierversuchen Verhaltensänderungen auslösen, die zumindest in einigen Aspekten mit denen der bekannten Psychopharmaka übereinstimmen. Um die Wirkungen der in diesem Test aktiven Peptide näher zu charakterisieren, wurden die anderen Verhaltenstests verwendet.

Im Schwimmtest sind Umwelteinflüsse von großer Bedeutung: Werden die Mäuse nicht unter konstanten klimatischen Bedingungen in einer reizarmen Umgebung gehalten, zeigen die mit Kochsalzlösung injizierten Kontrolltiere so wenig Immobilität, daß eine Wirkung weder bei Peptiden noch bei

Psychostimulantien und Antidepressiva nachweisbar ist. Auch Mäuse, die einige Stunden vor dem Test Temperaturen von mehr als 23-24°C ausgesetzt sind, zeigen diesen Effekt.

Tabelle 2 zeigt das Ergebnis eines Versuchs, in dem Mäuse, die im Sommer unter inkonstanten klimatischen Bedingungen in einem natürlichen hell-dunkel-Rhythmus gehalten wurden und in den letzten Stunden vor dem Test Temperaturen von 26-28°C ausgesetzt waren, im Schwimmtest getestet wurden: Der Vergleich mit den unter "Normalbedingungen" erhaltenen Ergebnissen (Tab. 4) zeigt deutlich den Einfluß von Umweltfaktoren auf das Verhalten in diesem Test. Bei den anderen Tests war ein vergleichbarer Einfluß von Umweltfaktoren auf das Verhalten nicht zu erkennen.

T A B E L L E 2

Schwimmtest mit Mäusen, die vor dem Test hohen Temperaturen ausgesetzt waren.

N ⁺	Injektion ⁺	Verhalten ⁺⁺	
		Immobilität	Fluchtverhalten
7	NaCl	37,4 ± 15,1	94,6 ± 23,9
7	Imipramin 40mg/kg	46,7 ± 19,0	92,0 ± 27,5
7	Coffein 80mg/kg	64,7 ± 18,5	86,9 ± 18,4

⁺ Zahl der Mäuse pro Gruppe.

⁺ Subcutane Injektionen eine Stunde vor Testbeginn.

⁺⁺ In Sekunden pro Test, Mittelwert ± S.E.M.

b) Der "Mäusekratztest".

Der Test wurde folgendermaßen durchgeführt: Die Maus wurde nach der Injektion in einen 28,5 x 42 cm großen Plastikkäfig gesetzt und 6-11 Minuten nach der Injektion wurden die einzelnen Verhaltensweisen quantitativ bestimmt. Immobilität, Putzen und Kratzen wurden kumulativ in Sekunden pro Test bestimmt, Aufrichten als Häufigkeit pro Test und Lokomotion an Hand des Überkreuzens von drei gedachten Linien im Käfig. Die im Schwimmtest aktiven Peptide bewirkten in diesem Test eine Reduktion der Immobilität und eine Stimulation von Kratzen und Putzverhalten.

T A B E L L E 3

Immobilität im "Kratztest" nach intracerebroventrikulärer Injektion.

N ⁺	Behandlung ⁺	Immobilität ⁺⁺
11	H	16,2 $\pm$ 7,5
10	H + Ä	87,6 $\pm$ 21,6 ^{**}
10	H + Ä + S	173,7 $\pm$ 25,8 ^{***}
10	H + Ä + S + I	172,8 $\pm$ 17,9 ^{***}

⁺ Zahl der Mäuse pro Gruppe.

⁺

H = Handling

Ä = Äthernarkose

S = Anstechen des Schädels

I = Injektion von 20µl NaCl.

⁺⁺ In Sekunden pro Test, Mittelwert $\pm$ S.E.M.

^{**} p < 0,01; ^{***} p < 0,001; Mann-Whitney's U-Test.

In diesem Test wurde das Verhalten von der intracerebro-ventrikulären Injektion beeinflußt (Tab. 3): Nicht injizierte Tiere zeigten signifikant weniger Immobilität als Tiere, die mit Kochsalzlösung injiziert waren oder denen der Schädel mit der Injektionsnadel angestochen wurde, ohne daß Material injiziert wurde. Auch hier können die Immobilitätsphasen also zumindest teilweise als "Streß-induzierte Immobilität" angesehen werden.

c) Der Röhrentest.

Der Röhrentest wurde als weiteres Modell für Streß-induzierte Immobilität entwickelt: 6 Minuten nach der Injektion wurde die Maus in eine innen angefeuchtete, 30cm lange Plexiglasröhre mit einem Innendurchmesser von 3,6cm geschoben und die Röhre aufrecht hingestellt. Nach weiteren 2 Minuten wurden Immobilität, Putzen, Kratzen und Fluchtversuche vier Minuten lang in Sekunden pro Testsitzung gemessen.

II. Wirkungen von Peptiden.

1. Hormone des Hypophysenhinterlappens.

Im Verlauf der Versuche zeigte sich, daß Oxytocin und Vasopressin sowie verwandte Peptide in den verwendeten Verhaltens-tests besonders charakteristische Wirkungen auslösen. Durch einen Vergleich der Verhaltensänderungen in den drei verschiedenen Tests ließen sich diese Effekte eindeutig von denen anderer verhaltensändernder Substanzen unterscheiden.

a) Wirkungen im Schwimmtest.

Im Schwimmtest verursachten intracerebroventrikulär appliziertes Oxytocin und Vasopressin eine statistisch signifikante Reduktion der Immobilität und eine Erhöhung der mit Fluchtversuchen verbrachten Zeit (Fig. 1). Die Wirkungen waren qualitativ und quantitativ nicht von denen von Coffein und Imipramin zu unterscheiden (Tab. 4).

b) Wirkungen im Kratztest.

In diesem Test verursachten die Hinterlappenhormone eine Reduktion der Immobilitätsphasen. Kratzen mit den Hinterbeinen und Putzen mit den Vorderpfoten und dem Mund wurden bereits bei sehr niedriger Dosierung stimuliert (Fig. 2). Eine geringe Stimulierung der lokomotorischen Aktivität bei höherer Dosierung konnte in einigen, aber nicht allen Versuchen beobachtet werden. Die Häufigkeit des Aufrichtens auf die Hinterbeine war bei niedrigen Dosen unverändert und bei hohen Dosen reduziert (Tab. 5). Bei hoher Dosierung traten Verhaltensweisen auf, die bei den Kontrolltieren äußerst

T A B E L L E 4

Wirkungen von Drogen und Peptiden im Schwimmtest.

N ⁺	Behandlung ⁺	Verhalten ⁺⁺	
		Immobilität	Fluchtverhalten
6	Coffein, 80mg/kg i.p.	102,8 ± 14,0 [*]	65,7 ± 9,1 ^{**}
9	Imipramin, 50mg/kg i.p.	74,4 ± 13,6 ^{**}	94,4 ± 20,4 ^{**}
10	NaCl	148,9 ± 12,7	15,3 ± 5,9
4	Morphin-HCl 1µg i.c.	231,3 ± 8,1	6,3 ± 6,3
4	Morphin-HCl 10µg i.c.	223,8 ± 13,4	5,0 ± 4,0
5	NaCl	210,2 ± 17,0	9,8 ± 8,3
7	Oxytocin, 160 I.U./mg, 2µg i.c.	142,6 ± 28,9	10,4 ± 6,7
6	NaCl	179,2 ± 20,9	4,5 ± 3,7
5	Oxytocin, 160 I.U./mg, 20µg i.c.	56,6 ± 12,2 ^{**}	76,8 ± 20,2 ^{**}
5	NaCl	178,8 ± 25,8	7,0 ± 3,9
8	LVP, 100 I.U./mg, 20µg i.c.	105,0 ± 13,1 [*]	63,5 ± 22,7
8	NaCl	166,4 ± 20,4	32,6 ± 16,0
25	Extrakt aus 0,6g Hypophysen i.c.	46,0 ± 13,0 ^{***}	141,0 ± 17,8 ^{***}
9	NaCl	153,8 ± 18,9	23,8 ± 14,7

⁺ Zahl der Mäuse pro Gruppe.

⁺ i.p. = intraperitoneal, ca. 1 Stunde vor Testbeginn.

i.c. = intracerebroventrikulär, ca. 6 Minuten vor Testbeginn.

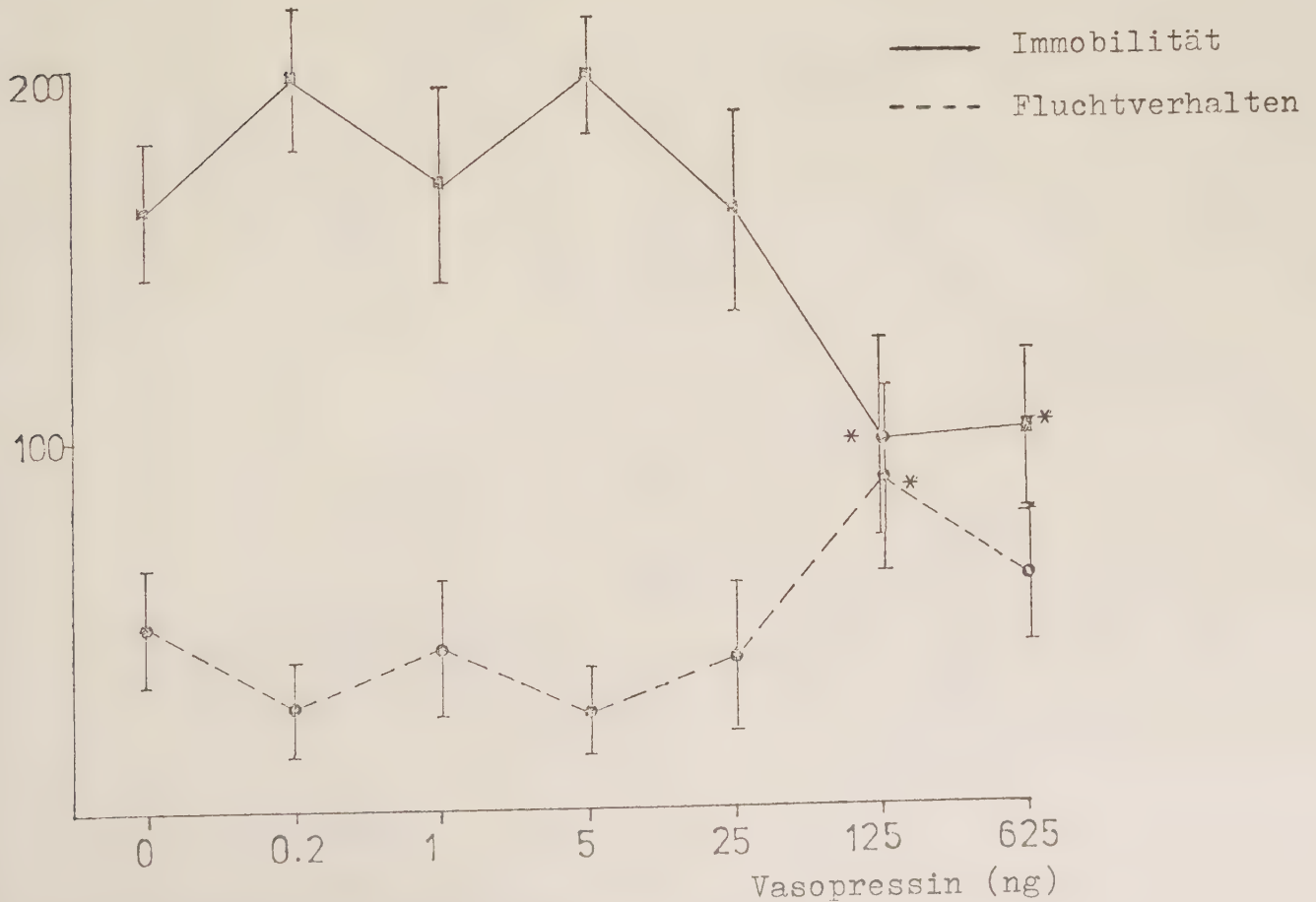
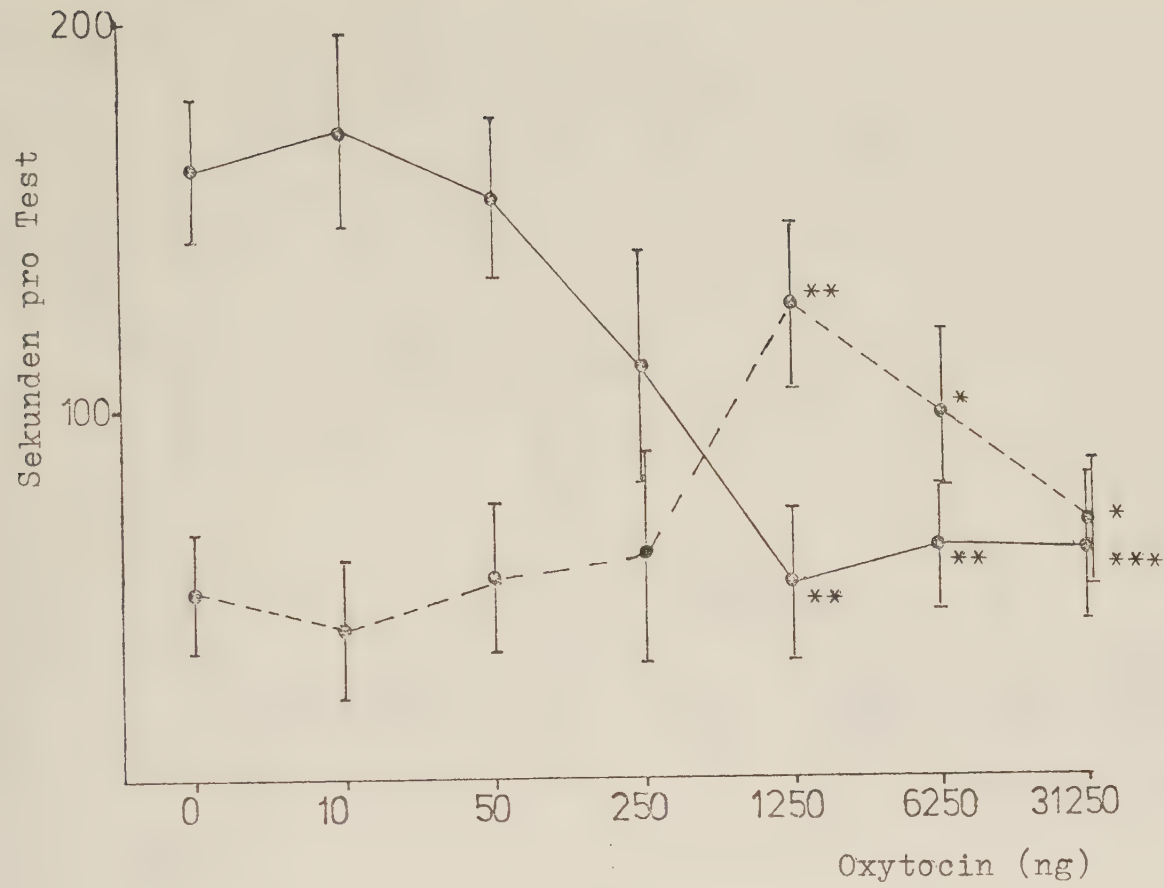
LVP = Lysin-vasopressin.

⁺⁺ In Sekunden pro Test, Mittelwert ± S.E.M.

^{*} p < 0,1; ^{**} p < 0,01; ^{***} p < 0,001; Mann-Whitney's U-Test.

FIG. 1

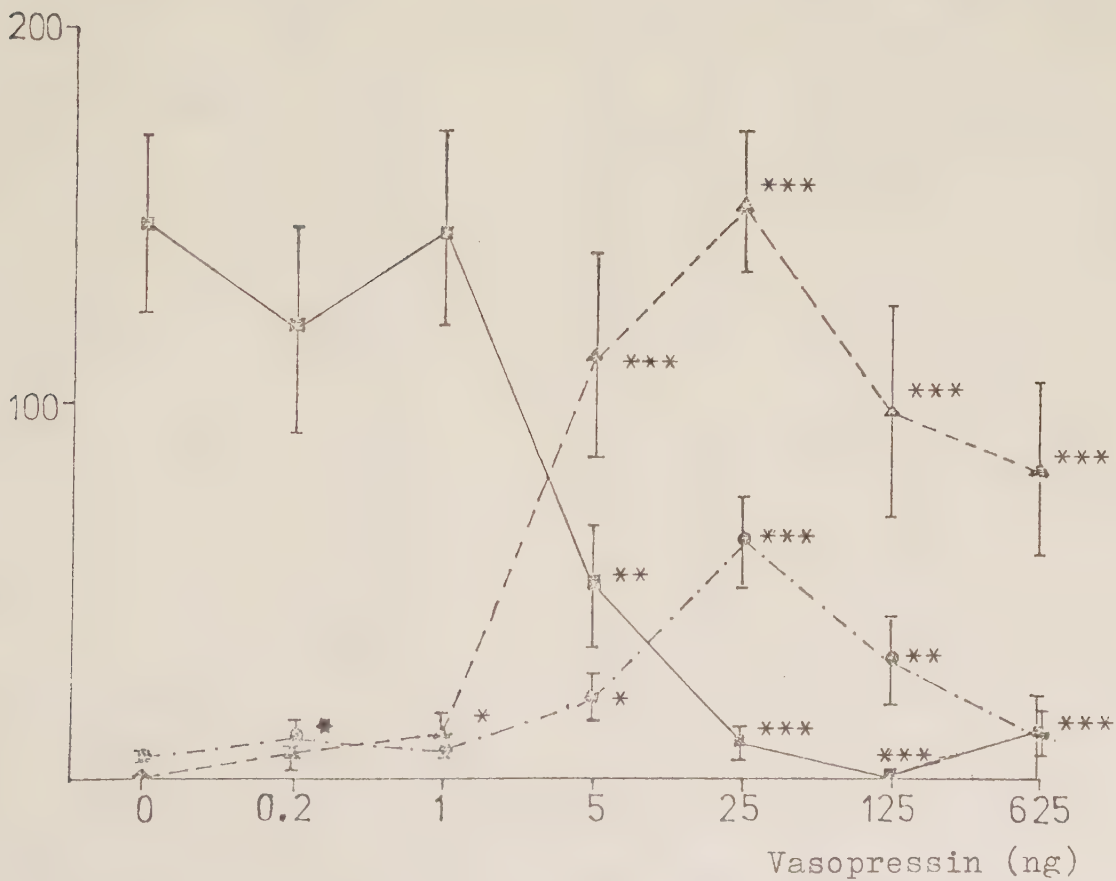
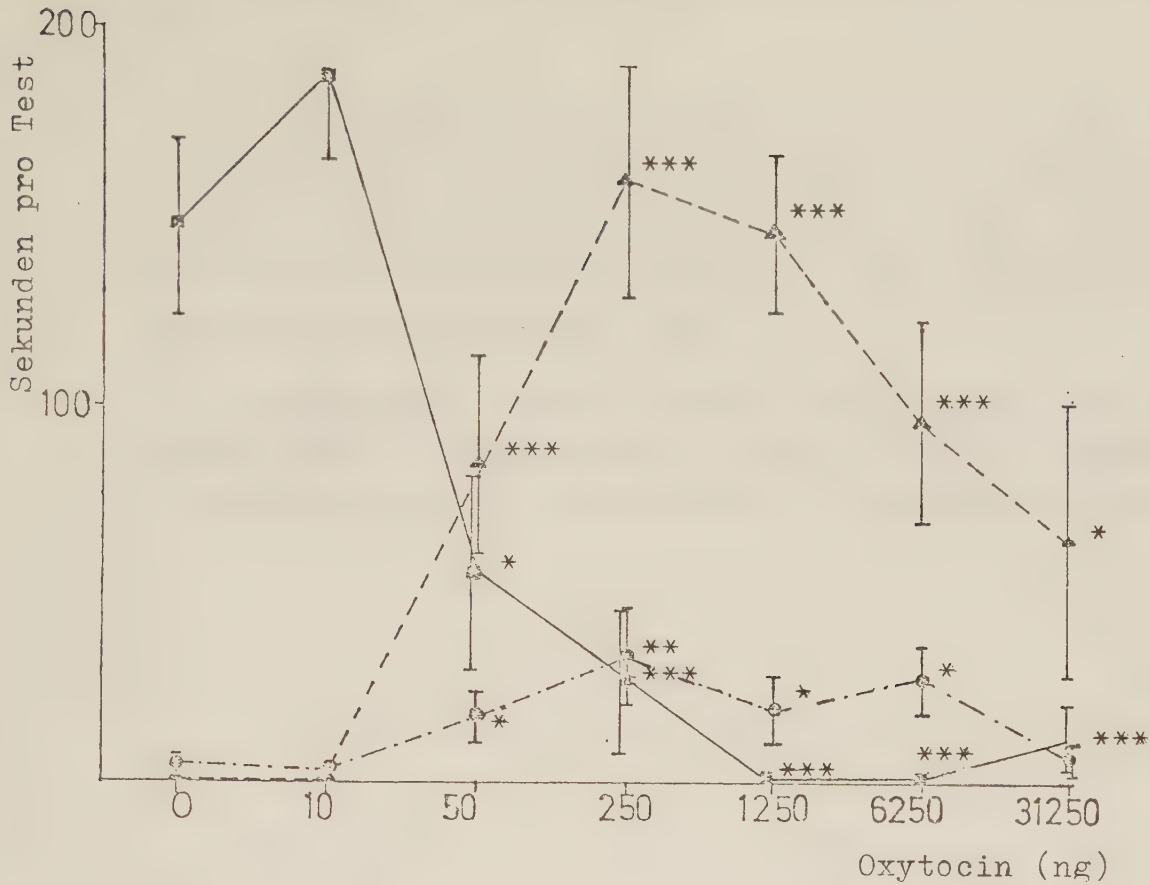
Wirkungen von Oxytocin und Arginin-vasopressin im Schwimmtest.



* $p \leq 0.1$; ** $p \leq 0.01$; Mann-Whitney's U-Test.

FIG. 2

Wirkungen von Oxytocin und Arginin-vasopressin im Kratztest.



— Immobilität; --- Kratzen; -.-.- Putzen.

* $p < 0,1$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Mann-Whitney's U-Test.

selten beobachtet wurden; Wühlen in der Streu (mit oder ohne stärkere Lokomotion) und Vokalisation waren häufig, und viele Mäuse zeigten ein charakteristisches Rotationsverhalten ("head-to-tail circling") mit stereotypen Bewegungen und geringer Lokomotion (Tab. 6).

In diesem Test lassen sich die Hinterlappenhormone eindeutig von den im Schwimmtest aktiven Psychostimulantien und Antidepressiva unterscheiden: Exzessives Kratzen ließ

T A B E L L E 5

Laufen und Aufrichten im Kratztest.

N ⁺	Behandlung [†]	Laufen	Aufrichten
15	NaCl	27,5 ± 5,7	9,3 ± 2,8
8	Oxytocin 10ng	23,3 ± 6,5	4,8 ± 1,2
9	50ng	29,4 ± 6,9	9,2 ± 3,0
9	250ng	66,3 ± 16,7 ^{**}	7,9 ± 1,7
9	1,25µg	45,9 ± 13,2	7,3 ± 2,7
9	6,25µg	26,2 ± 11,3	4,3 ± 1,6
9	31,25µg	18,3 ± 5,9	1,8 ± 0,6 ^{**}
9	AVP 0,2ng	32,7 ± 7,6	8,8 ± 2,5
9	1ng	22,7 ± 6,6	7,4 ± 2,6
9	5ng	27,2 ± 5,3	6,7 ± 1,7
9	25ng	34,9 ± 8,0	7,1 ± 2,8
9	125ng	29,1 ± 6,3	3,0 ± 1,0 [*]
9	625ng	21,7 ± 5,9	2,6 ± 1,4 [*]

⁺ Zahl der Mäuse pro Gruppe.

[†] Intracerebroventrikuläre Injektionen, AVP = Arginin-vasopressin.

* p < 0,1; ** p < 0,01; *** p < 0,001; Mann-Whitney's U-Test.

sich bei Mäusen, die mit derartigen Drogen behandelt waren, nicht nachweisen. In dem in Tabelle 7 gezeigten Experiment wurden die Tiere eine Stunde nach der intraperitonealen Injektion der Droge und 6 Minuten vor dem Beginn des Tests intracerebroventrikulär mit 20µl Kochsalzlösung injiziert: Bei den mit den Drogen behandelten Tieren trat kein exzessives Kratzen auf.

T A B E L L E 6

Verhaltensweisen im "Kratztest".

N ⁺	Behandlung ⁺		Verhalten ⁺⁺				
			W	V	R	K	P
15	NaCl		1	0	0	4	11
8	Oxytocin	10ng	0	0	0	1	4
9		50ng	1	0	0	9 ^{***}	8
9		250ng	3	0	0	7 [*]	9
9		1,25µg	7 ^{***}	2	3 [*]	9 ^{***}	8
9		6,25µg	5 [*]	1	2	9 ^{***}	9
9		31,25µg	4 [*]	4 [*]	5 ^{**}	5	4
9	AVP	0,2ng	0	0	0	4	8
9		1ng	0	0	0	6 [*]	8
9		5ng	1	0	0	9 ^{***}	8
9		25ng	3	0	1	9 ^{***}	9
9		125ng	4 [*]	4 [*]	2	8 ^{**}	9
9		625ng	3	3 [*]	5 ^{**}	9 ^{***}	7

⁺ Zahl der Mäuse pro Gruppe.

⁺ Intracerebroventrikuläre Injektionen, AVP = Arginin-vasopressin.

⁺⁺ Zahl der Mäuse, die das Verhalten zeigen.

W = Wühlen in der Streu, V = Vokalisation, R = Rotationsverhalten,

K = Kratzen, P = Putzen.

* p < 0,1; ** p < 0,01; *** p < 0,001; Fisher-Yates-Test.

T A B E L L E 7

Exzessives Kratzen nach Psychostimulantien und Antidepressiva.

N ⁺	Vorbehandlung ⁺	Testinjektion [§]	exz. Kr. ⁺⁺
8	NaCl	NaCl	0
8	D-Amphetamin 10mg/kg	NaCl	0
8	Coffein 80mg/kg	NaCl	0
8	Imipramin 30mg/kg	NaCl	0
8	Amitriptylin 30mg/kg	NaCl	0
8	Pargylin 30mg/kg	NaCl	0
8	Tranylcypromin 30mg/kg	NaCl	0
8	NaCl	LVP 5ng	7

⁺ Zahl der Mäuse pro Gruppe.

⁺ Intraperitoneale Injektion 60-70 Minuten vor Testbeginn.

[§] Intracerebroventrikuläre Injektion 6 Minuten vor Testbeginn.
LVP = Lysin-vasopressin.

⁺⁺ Zahl der Mäuse, die sich während einer dreiminütigen Beobachtungsperiode mehr als 10 Sekunden kratzen.

c) Wirkungen im Röhrentest.

In diesem Test zeigten die mit Kochsalzlösung injizierten Kontrolltiere ausgedehnte Immobilitätsphasen, die sich oft über die gesamte Testzeit erstreckten. Fluchtversuche wurden selten beobachtet. Die Hinterlappenhormone verursachten eine Reduktion der Immobilitätsphasen und eine Stimulierung flucht-orientierten Verhaltens: Die Mäuse versuchten, in der Röhre hochzuklettern (Fig. 3). Exzessives Kratzen und Putzen kam nur bei sehr wenigen Mäusen vor (Tab. 8). Eine signifikante Stimulation dieser Verhaltensweisen im Röhrentest war nur

T A B E L L E 8

Kratzen und Putzen im Röhrentest.

N ⁺	Behandlung ⁺	Verhalten ⁺⁺	
		Kratzen	Putzen
18	NaCl	0,0 ± 0,0	2,6 ± 0,9
9	Oxytocin 10ng	0,0 ± 0,0	4,0 ± 1,7
9	50ng	0,9 ± 0,9	4,1 ± 1,3
9	250ng	0,3 ± 0,3	3,9 ± 2,2
9	1,25µg	0,6 ± 0,6	9,4 ± 7,5
9	6,25µg	1,3 ± 1,2	2,0 ± 1,4
9	31,25µg	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1 [*]
9	AVP 1ng	0,0 ± 0,0	4,0 ± 1,3
9	5ng	0,9 ± 0,7	4,4 ± 0,9 [*]
9	25ng	2,7 ± 1,6 [*]	3,8 ± 1,5
9	125ng	7,7 ± 7,7	1,3 ± 0,9
9	625ng	5,7 ± 5,7	0,3 ± 0,3 [*]

⁺ Zahl der Mäuse pro Gruppe.

⁺ Intracerebroventrikuläre Injektion, AVP = Arginin-vasopressin.

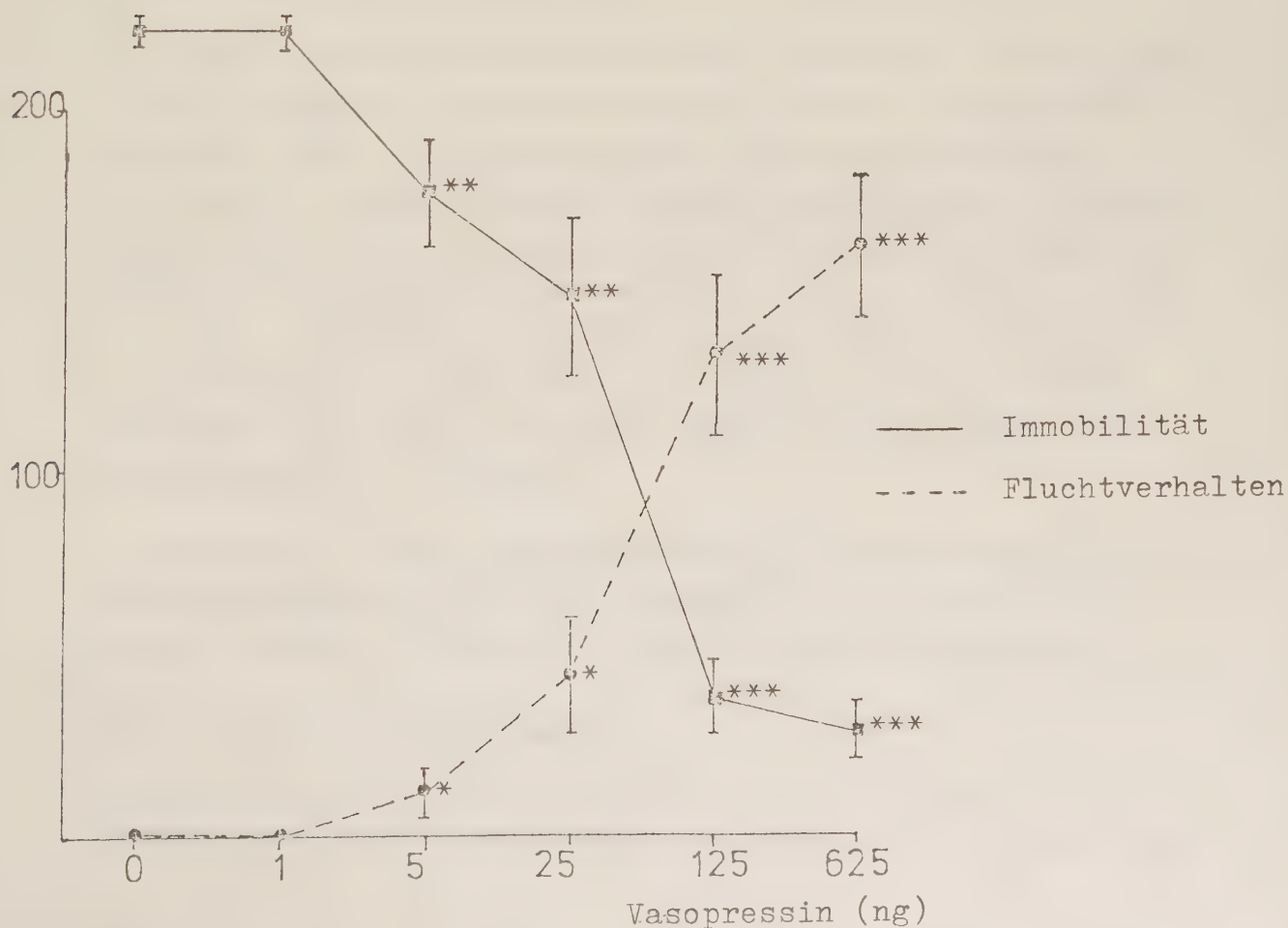
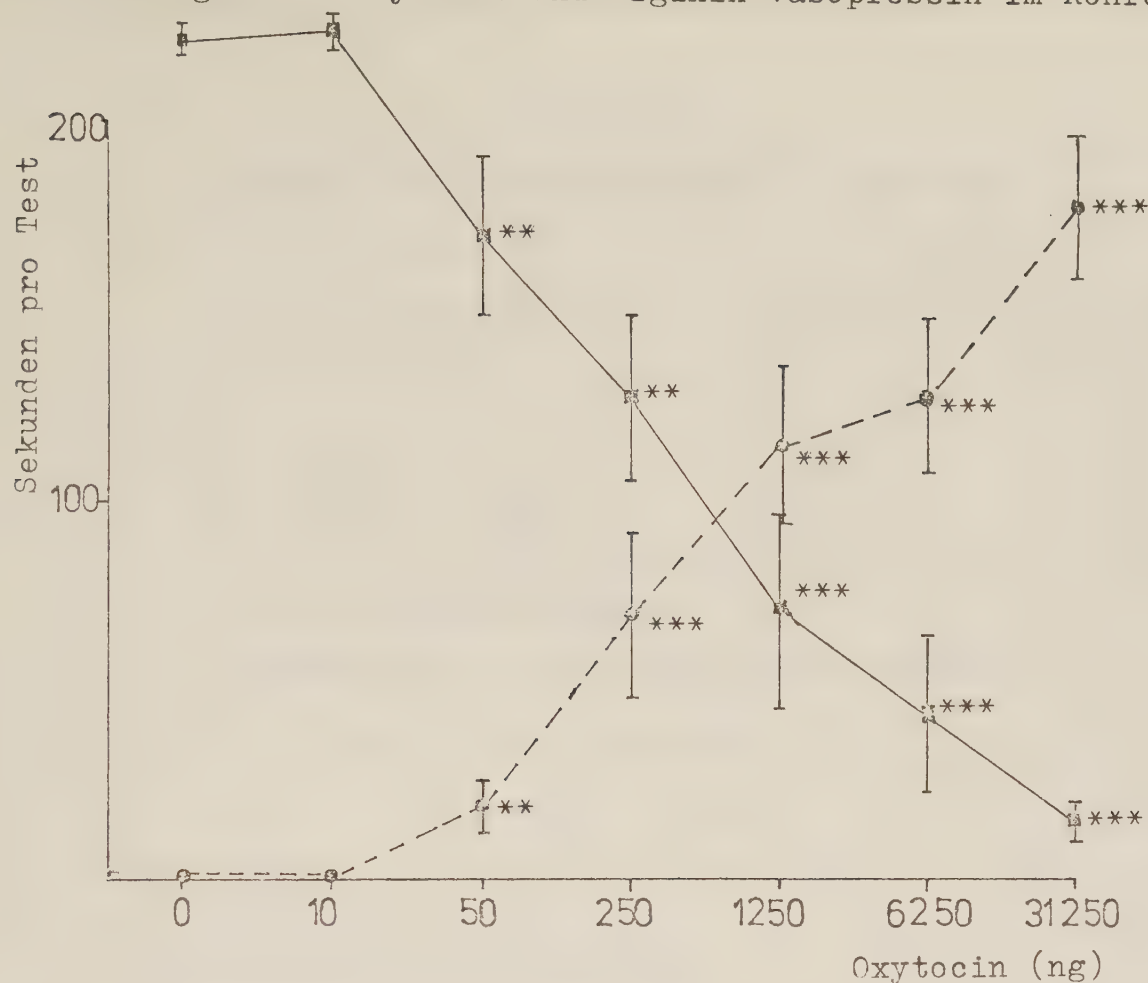
⁺⁺ In Sekunden pro Test, Mittelwert ± S.E.M.

^{*} p < 0,1; Mann-Whitney's U-Test.

in wenigen Experimenten zu beobachten (z.B. Tabelle 29, S.58). Imipramin und Coffein verursachten in diesem Test keine vergleichbaren Wirkungen (Tab. 9).

Die Ergebnisse in den drei Verhaltenstests zeigen, daß die Hinterlappenhormone Verhaltensänderungen verursachen, die zwar in einzelnen Aspekten mit denen bekannter Psychopharmaka vergleichbar sind, sich aber selbst durch einfache Verhaltenstests eindeutig von diesen unterscheiden lassen.

Wirkungen von Oxytocin und Arginin-vasopressin im Röhrentest.



* $p < 0,1$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Mann-Whitney's U-Test.

T A B E L L E 9

Wirkungen von Coffein und Imipramin im Röhrentest.

N ⁺	Behandlung ⁺	Verhalten ⁺⁺	
		Immobilität	Fluchtverhalten
8	NaCl	201,8 $\pm$ 12,5	7,8 $\pm$ 3,2
8	Coffein 80mg/kg	192,9 $\pm$ 11,2	7,9 $\pm$ 5,0
8	Imipramin 50mg/kg	220,9 $\pm$ 12,1	5,4 $\pm$ 5,2

⁺ Zahl der Mäuse pro Gruppe.

⁺ Subcutane Injektion 60-70 Minuten vor Testbeginn.

⁺⁺ In Sekunden pro Test, Mittelwert $\pm$ S.E.M.

2. Wirkungen anderer Peptide.

Um einen Überblick über die Verhaltenseffekte von Neuropeptiden zu gewinnen und um die durch Gehirn- und Hypophysenextrakte (Kap. III) verursachten Verhaltensänderungen mit den Wirkungen bekannter Peptide vergleichen zu können, wurde eine größere Zahl von Peptiden im Kratztest und im Röhrentest untersucht. Wie Tabelle 10 und 11 zeigen, waren bei sehr vielen Peptiden Verhaltensänderungen in den verwendeten Tests nachweisbar. In keinem Fall waren diese Wirkungen mit denen der Hinterlappenhormone und der Hypophysenextrakte identisch.

Peptide, bei denen keine statistisch signifikanten Verhaltensänderungen ($p < 0,01$; Mann-Whitney's U-Test) auftraten, wurden in Tabelle 10 und 11 nicht aufgenommen.

Inaktiv waren im Kratztest:

Prolyl-leucyl-glycinamid (= MIF-1), 2 μ g und 20 μ g.

LHRH (Luteinizing hormone releasing hormone), 2 μ g und 20 μ g.

Threonyl-valyl-leucin ("Schizophrenia-related peptide"),
2µg und 20µg.

Cholecystokinin-Octapeptid, 1,25µg.

Leucin-enkephalin, 2µg und 20µg.

α-Endorphin, 2,5µg.

Im Röhrentest war inaktiv:

α-MSH, 2µg und 20µg.

Aus Gründen der Arbeitersparnis wurden einige der im
Kratztest inaktiven Peptide im Röhrentest nicht mehr
untersucht.

F I G. 4

Formeln einiger Peptide.

Pyr-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu

Neurotensin

Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂

Substanz P

Pyr-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂

Bombesin

Cys-Asn-Cys-Lys-Ala-Pro-Glu-Thr-Ala-

└──┐ ┌──────────┐
Leu-Cys-Ala-Arg-Arg-Cys-Gln-Gln-His-NH₂

Apamin

Bei einigen der aktiven Peptide wurde die Dosisabhängigkeit der Wirkung untersucht:

a) Substanz P.

Dieses Peptid (Fig. 4) kommt außer im Gehirn auch in anderen Organen vor (89). Es übt verschiedene Wirkungen an peripheren Organen aus, zum Beispiel Vasodilation und Kontraktion der glatten Muskulatur des Darms. Es wurde 1970 an Hand seiner sialogogischen Wirkung aus Hypothalamusgewebe von Rindern isoliert und strukturell aufgeklärt (23).

Im Nervensystem ist Substanz P vermutlich ein Transmitter an sensorischen Nervenendigungen im Rückenmark (89,109,145) und in einigen Strukturen des Gehirns, wie der Substantia nigra, dem Hypothalamus und dem Nucleus accumbens (22,66,73,104,113).

Nach intracerebroventrikulärer Injektion stimulierte Substanz P im Kratztest das Putzverhalten bei nur geringen Wirkungen auf die anderen Verhaltensparameter (Tab. 10 und 12). Die Wirkungen auf Immobilität, Putzen und Fluchtverhalten im Röhrentest waren aus unbekannten Gründen schlecht reproduzierbar (Tab. 11 und 13).

b) Neurotensin.

Neurotensin (Fig. 4), das ebenso wie Substanz P aus Hypothalamusgewebe von Rindern isoliert wurde (19), löst an peripheren Organen Wirkungen aus, die mit denen von Substanz P vergleichbar sind. Es kommt in verschiedenen Regionen des Gehirns vor und verursacht nach zentralnervöser Applikation zahlreiche physiologische Wirkungen (102,103).

In den hier verwendeten Verhaltenstests (Tab. 12 und 13) war bei mit Neurotensin behandelten Mäusen eine starke Verminderung der motorischen Aktivität nachweisbar, die

T A B E L L E 10

Wirkungen von Peptiden im Kratztest.

Peptid [†]	Immobilität	Putzen	Kratzen	Laufen	Aufrichten
NaCl	109,2 ± 15,6	8,4 ± 3,4	1,0 ± 0,5	34,9 ± 3,9	15,4 ± 2,5
TRH 2µg	178,5 ± 24,5 [*]	7,1 ± 4,1	0,8 ± 0,5	9,6 ± 2,9 ^{***}	1,4 ± 0,6 ^{***}
TRH 20µg	105,5 ± 25,1	6,5 ± 3,6	3,4 ± 3,4	24,4 ± 6,9	2,1 ± 1,2 ^{***}
Somatostatin 2µg	34,4 ± 11,8 ^{***}	28,0 ± 5,0 ^{***}	14,5 ± 5,8 ^{***}	48,5 ± 5,6 [*]	21,0 ± 2,7 [*]
Somatostatin 20µg	90,5 ± 36,1	11,6 ± 4,9	10,1 ± 4,6 ^{**}	44,0 ± 13,9	26,9 ± 7,4
α-MSH 2µg	165,9 ± 29,9 [*]	7,3 ± 3,0	0,5 ± 0,3	19,6 ± 6,2 [*]	6,3 ± 2,3 [*]
α-MSH 20µg	207,1 ± 24,2 ^{**}	0,0 ± 0,0 ^{**}	0,0 ± 0,0 [*]	18,3 ± 7,2 [*]	0,5 ± 0,3 ^{***}
ACTH 0,2 I.U.	132,3 ± 36,1	11,8 ± 6,1	0,1 ± 0,1 [*]	24,1 ± 7,7 [*]	8,6 ± 3,6 [*]
ACTH 2 I.U.	91,9 ± 19,3	69,1 ± 24,1 ^{**}	13,5 ± 5,3 ^{***}	15,9 ± 4,4 [*]	2,0 ± 0,6 ^{***}
Substanz P 2µg	87,5 ± 33,5	31,4 ± 11,1 ^{**}	1,4 ± 0,6 [*]	42,5 ± 9,3	19,6 ± 6,0 ^{**}
Substanz P 20µg	69,5 ± 35,5 [*]	67,1 ± 22,2 ^{**}	7,6 ± 2,6 [*]	38,9 ± 19,6	3,3 ± 1,0 ^{**}
Neurotensin 2µg	286,4 ± 13,3 ^{***}	0,0 ± 0,0 ^{**}	0,0 ± 0,0 [*]	4,0 ± 3,9 ^{***}	1,0 ± 1,0 ^{***}
Neurotensin 20µg	289,6 ± 6,1 ^{***}	0,0 ± 0,0 ^{**}	0,0 ± 0,0 [*]	1,8 ± 1,4 ^{***}	0,3 ± 0,3 ^{***}
Angiotensin 2µg	117,6 ± 37,8	5,9 ± 4,9	0,8 ± 0,8	29,4 ± 6,2	10,0 ± 3,1
Angiotensin 20µg	194,0 ± 36,4 [*]	5,4 ± 3,5	1,7 ± 1,7	15,6 ± 6,7 [*]	4,0 ± 1,9 ^{**}
Bradykinin 2µg	151,6 ± 44,9	6,9 ± 2,3	0,3 ± 0,3	40,9 ± 19,3	13,1 ± 6,0
Bradykinin 20µg	241,9 ± 19,9 ^{***}	0,1 ± 0,1 ^{**}	0,0 ± 0,0 [*]	10,6 ± 3,8 ^{**}	0,8 ± 0,5 ^{***}
DSIP 2µg	144,6 ± 22,8	18,8 ± 12,2	3,4 ± 1,6 ^{**}	19,0 ± 5,4 [*]	6,9 ± 1,9 [*]
DSIP 20µg	96,3 ± 24,8	6,8 ± 3,9	1,0 ± 0,8	59,9 ± 19,1	15,5 ± 5,5
Gastrin 2µg	98,1 ± 12,4	13,9 ± 9,3	1,1 ± 0,6	28,3 ± 5,4	13,0 ± 2,4
Gastrin 20µg	176,5 ± 25,7 [*]	6,8 ± 2,8	2,6 ± 1,8	21,3 ± 4,8 [*]	4,1 ± 1,3 ^{**}
DALA 2µg	282,3 ± 14,1 ^{**}	0,3 ± 0,3 ^{**}	0,0 ± 0,0 [*]	1,0 ± 0,6 ^{***}	0,4 ± 0,4 ^{***}

Zahl der Mäuse pro Gruppe.

DSIP = Delta-sleep inducing peptide, DALA = 2-D-Ala-met-enkephalinamid.

p < 0,1; ** p < 0,01; *** p < 0,001; Mann-Whitney's U-Test.

T A B E L L E 11

Wirkungen von Peptiden im Röhrentest.

N ⁺	Peptid ⁺	Immobilität	Putzen	Kratzen	Fluchtverhalten
30	NaCl	216,7 ± 3,4	2,7 ± 0,5	0	4,2 ± 1,9
8	TRH 2µg	217,4 ± 4,9	1,3 ± 0,8	0	9,8 ± 3,5 ^{**}
8	TRH 20µg	194,5 ± 15,3	2,3 ± 1,8	0	28,6 ± 14,5 ^{**}
8	LHRH 2µg	211,8 ± 11,0	2,0 ± 1,1	0	9,6 ± 7,0
8	LHRH 20µg	182,6 ± 14,7 ^{**}	3,1 ± 1,3	0	8,4 ± 3,9 [*]
8	Somatostatin 2µg	172,1 ± 16,9 ^{**}	13,6 ± 3,4 ^{**}	0	4,1 ± 2,1
8	Somatostatin 20µg	186,1 ± 16,3 [*]	2,5 ± 1,3	0	19,6 ± 14,9 [*]
8	ACTH 0,2 I.U.	207,5 ± 5,5 [*]	7,9 ± 1,3 ^{***}	0	2,6 ± 2,6
8	ACTH 2 I.U.	210,5 ± 14,1	1,4 ± 1,2	0	1,8 ± 1,4
8	Substanz P 2µg	170,3 ± 13,3 ^{**}	3,9 ± 1,8	0	37,3 ± 10,9 ^{***}
8	Substanz P 20µg	131,9 ± 22,1 ^{***}	22,6 ± 6,0 ^{***}	0	13,5 ± 6,0 ^{**}
8	Neurotensin 2µg	236,1 ± 2,3 ^{**}	0,0 ± 0,0 ^{**}	0	0,0 ± 0,0 [*]
8	Neurotensin 20µg	238,5 ± 0,8 ^{***}	0,0 ± 0,0 ^{**}	0	0,0 ± 0,0 [*]
8	Bradykinin 2µg	218,3 ± 5,0	2,3 ± 1,9 [*]	0	1,0 ± 1,0
8	Bradykinin 20µg	239,8 ± 0,2 ^{***}	0,0 ± 0,0 ^{**}	0	0,0 ± 0,0 [*]
8	Leu-enkephalin 2µg	196,5 ± 21,1	1,1 ± 0,6 [*]	0	2,8 ± 2,4
8	Leu-enkephalin 20µg	233,8 ± 3,9 ^{**}	0,0 ± 0,0 ^{**}	0	0,0 ± 0,0 [*]
8	DALA 2µg	234,5 ± 3,6 ^{**}	0,3 ± 0,3 ^{**}	0	0,0 ± 0,0 [*]

⁺ Zahl der Mäuse pro Gruppe.

⁺ DALA = 2-D-Ala-met-enkephalinamid.

* p < 0,1; ** p < 0,01; *** p < 0,001; Mann-Whitney's U-Test.

noch nach 20 Nanogramm hoch signifikant war (Tab. 12). Dies ergänzt frühere Angaben über eine Reduktion der Spontanaktivität durch zentralnervös appliziertes Neurotensin (103). Die für die Aktivitätsminderung notwendige Dosis entspricht etwa den Dosen, die zu einer Senkung der Körpertemperatur und zur Verminderung der Schmerzempfindlichkeit bei Mäusen notwendig sind (102, 103).

c) Bombesin.

Bombesin, das eine entfernte strukturelle Ähnlichkeit mit Substanz P besitzt (Fig. 4), wurde aus der Haut des Frosches *Bombina bombina* isoliert (3). Bombesin-ähnliches immunreaktives Material wurde aber auch in Gehirn, Gastrointestinaltrakt, Lunge und Plasma von Säugetieren nachgewiesen (15). Die höchste Konzentration an Bombesin-ähnlichem immunreaktivem Material im Zentralnervensystem findet sich im Hypothalamus.

Neben zahlreichen peripheren Wirkungen, die denen von Substanz P und Neurotensin ähnlich sind, wurden verschiedene zentralnervöse Wirkungen von Bombesin beschrieben, zum Beispiel ein "Poikilothermie erzeugender" Effekt, der über die Area praeoptica vermittelt wird (14,114) und eine zentralnervös ausgelöste Erhöhung des Blutglucosespiegels, die durch eine Stimulierung des sympathischen Nervensystems und der Catecholamin-Freisetzung aus dem Nebennierenmark vermittelt wird (16). Auch eine Induktion von Putzverhalten bei Mäusen wurde beschrieben (78).

In Tabelle 12 ist zu sehen, daß Bombesin mehrere Verhaltensparameter signifikant beeinflusst: Am auffallendsten ist eine starke Stimulierung von Putzen und Kratzen. Diese Wirkung kann von der Wirkung Vasopressin-ähnlicher Peptide leicht unterschieden werden: Im Röhrentest (Tab. 13) induziert Bombesin weiterhin exzessives Putzen und Kratzen,

T A B E L L E 12

Wirkungen von Peptiden im Kratztest:

Dosisabhängigkeit.

Peptid	Immobilität	Putzen	Kratzen	Laufen	Aufrichten
NaCl	129,7 ± 13,3	24,3 ± 5,8	1,2 ± 0,6	29,8 ± 4,7	9,4 ± 1,9
Substanz P 200ng	103,7 ± 21,4	18,5 ± 4,9	1,0 ± 0,4	36,4 ± 8,2	13,3 ± 3,4*
Substanz P 1µg	119,5 ± 18,8	25,7 ± 5,8	2,0 ± 1,8	30,5 ± 7,5	12,0 ± 4,1
Substanz P 5µg	111,0 ± 21,0	52,5 ± 8,7**	3,6 ± 1,7	29,7 ± 6,4	9,5 ± 3,5
Bombesin 4ng	157,8 ± 27,8	23,2 ± 7,5	0,7 ± 0,3	29,9 ± 9,8	9,3 ± 3,4
Bombesin 20ng	186,2 ± 19,3*	40,7 ± 7,3*	3,2 ± 1,8*	13,4 ± 3,8*	2,4 ± 1,2**
Bombesin 100ng	19,0 ± 11,2***	129,6 ± 15,8***	117,8 ± 11,9***	17,5 ± 5,4*	1,0 ± 0,5**
Bombesin 500ng	0,5 ± 0,5***	127,4 ± 7,5***	146,9 ± 4,7***	14,3 ± 2,6*	0,6 ± 0,4**
Neurotensin 0,8ng	166,3 ± 21,5*	12,4 ± 2,3	0,1 ± 0,1	24,9 ± 5,3	7,9 ± 2,9
Neurotensin 4ng	171,7 ± 16,0*	9,7 ± 2,5*	0,1 ± 0,1*	24,3 ± 3,7	7,0 ± 1,6
Neurotensin 20ng	239,0 ± 17,5***	1,9 ± 1,2***	0,0 ± 0,0*	15,6 ± 6,3*	3,3 ± 1,9**
Neurotensin 100ng	269,3 ± 16,5***	0,0 ± 0,0***	0,0 ± 0,0*	10,3 ± 6,4**	0,8 ± 0,7**
Neurotensin 500ng	277,3 ± 13,4***	0,0 ± 0,0***	0,0 ± 0,0*	5,0 ± 3,4**	0,9 ± 0,6**
Apamin 0,4ng	131,1 ± 22,6	15,9 ± 4,9	1,8 ± 1,0	38,7 ± 11,9	10,7 ± 2,8
Apamin 2ng	186,8 ± 17,6**	7,8 ± 3,8*	0,3 ± 0,1	25,3 ± 7,9	3,8 ± 1,4*
Apamin 10ng	291,6 ± 2,8***	0,4 ± 0,4**	0,0 ± 0,0	1,8 ± 0,7**	0,2 ± 0,2**

Zahl der Mäuse pro Gruppe.

p < 0,1; ** p < 0,01; *** p < 0,001; Mann-Whitney's U-Test.

T A B E L L E 13

Wirkungen von Peptiden im Röhrentest:
Dosisabhängigkeit.

N ⁺	Peptid	Verhalten ⁺⁺			
		Immobilität	Putzen	Kratzen	Fluchtverhalten
16	NaCl	227,9 ± 3,6	2,1 ± 0,9	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1
10	Substanz P 1µg	213,2 ± 5,3 ^{**}	1,9 ± 1,0	0,5 ± 0,5	4,8 ± 4,0
10	Substanz P 5µg	208,6 ± 9,4 [*]	6,4 ± 3,8	0,0 ± 0,0	1,6 ± 1,1
10	Bombesin 20ng	215,4 ± 10,6	13,2 ± 6,0	0,7 ± 0,7	0,0 ± 0,0
10	Bombesin 100ng	130,4 ± 21,1 ^{***}	80,6 ± 17,1 ^{***}	11,0 ± 4,1 ^{**}	0,5 ± 0,3
10	Bombesin 500ng	47,2 ± 18,5 ^{***}	132,0 ± 14,8 ^{***}	47,2 ± 9,8 ^{***}	5,3 ± 3,3 [*]
8	Arg-vasotocin 50ng	50,9 ± 6,2 ^{***}	3,0 ± 2,3	0,0 ± 0,0	93,4 ± 14,9 ^{***}

⁺ Zahl der Mäuse pro Gruppe.

⁺⁺ In Sekunden pro Test, Mittelwert ± S.E.M.

^{*} p < 0,1; ^{**} p < 0,01; ^{***} p < 0,001; Mann-Whitney's U-Test.

während die mit einem Hinterlappenhormon behandelten Mäuse Fluchtverhalten zeigen.

d) Apamin.

Apamin (Fig. 4) ist ein Bestandteil des Bienengifts (49, 58). Als einziges in der vorliegenden Versuchsreihe getestetes Peptid zeigte es starke neurotoxische Wirkungen: Bereits eine Dosis von 50 Nanogramm führte zu starken generalisierten Krämpfen, bei niedrigerer Dosierung war die motorische Aktivität reduziert. Dies ähnelt den Wirkungen, die nach subcutaner Injektion von Apamin beschrieben sind (49, 58).

III. Untersuchung von Extrakten.

Die verwendeten Verhaltenstests sind einfach durchzuführen und liefern ohne großen Arbeitsaufwand eindeutige Resultate. Daher wurden mit Hilfe dieser Tests Extrakte aus Gehirn und Hypophyse von Schweinen untersucht, um festzustellen, ob außer den Hinterlappenhormonen weitere Neuropeptide in diesen Tests wirksam sind. In den ersten Versuchen wurde das Material nach dem in Fig. 5 gezeigten Schema aufgearbeitet. Die von der Sephadexsäule gewonnenen Fraktionen wurden zehnfach konzentriert und im Schwimmtest biologisch getestet. Fig. 6 zeigt als Beispiel die Wirkung des von Sephadex G-25 eluierten Materials aus einem Hypophysenextrakt im Schwimmtest: Die biologisch wirksamen Substanzen wurden kurz vor dem niedermolekularen Material eluiert, das toxisch war und daher nicht getestet werden konnte. Das aktive Material konnte durch Inkubation mit Pronase E vollständig inaktiviert werden (Tab. 14).

In diesen Versuchen wurden Extrakte aus dem Gesamtgehirn, aus Hirnstamm, Großhirnrinde und Hypophyse untersucht. Die Konzentration des aktiven Materials, bezogen auf das Frischgewicht, nahm in folgender Reihenfolge ab: Hypophyse > Hirnstamm > Cortex. Der Hypophysenvorderlappen enthielt nur ca. 1% des Materials aus den hinteren Anteilen der Hypophyse.

Um das biologisch aktive Material näher zu charakterisieren, wurden zwei größere Extraktionen mit Hypophysengewebe durchgeführt. Dabei wurde als zusätzlicher Reinigungsschritt eine Craig'sche Gegenstromverteilung zwischen n-Butanol und wäßrigem Puffer angewandt. Nur die Oberphase, die auf diese Weise von polaren Verunreinigungen weitgehend

T A B E L L E 14

Immobilität im Schwimmtest nach Inkubation mit Pronase E.

N ⁺	Injektion ⁺	Immobilität [§]
8	Pronase	186,2 $\pm$ 11,2
8	Extrakt	89,7 $\pm$ 18,1
8	Extrakt + Pronase	176,1 $\pm$ 13,8 ^{**}

⁺ Zahl der Mäuse pro Gruppe.

⁺ Pronase: 10 µg/ml Pronase E.

Extrakt: Material aus ca. 0,6 g Hypophysen/Maus.

[§] In Sekunden pro Test, Mittelwert $\pm$ S.E.M.

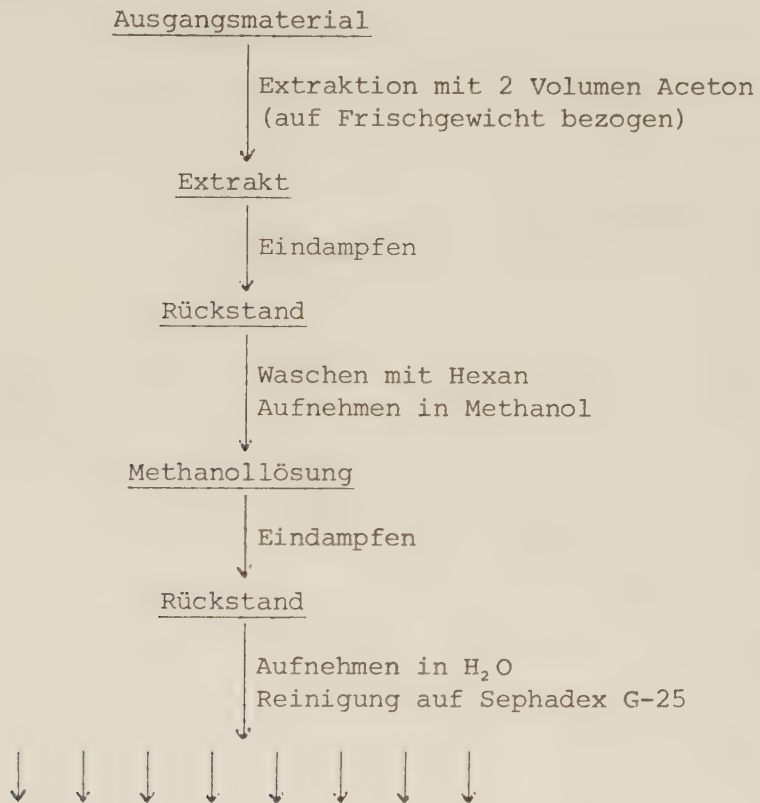
^{**} $p < 0,01$; Mann-Whitney's U-Test.

befreit war, wurde weiter gereinigt. Im ersten präparativen Ansatz wurde nach dem in Fig. 7 angegebenen Schema aufgearbeitet, Fig. 9 zeigt die Aufarbeitung des zweiten Ansatzes. Bei beiden Präparationen ließ sich das verhaltensaktive Material in mehrere Peaks auftrennen (Fig. 8 und Fig. 10). Die Wirkungen waren nicht von denen der bekannten Hinterlappenhormone zu unterscheiden (Tab. 15 und Tab. 16).

Einige der nach den in Fig. 8 und Fig. 10 gezeigten Trennungen gebildeten Pools von biologisch wirksamem Material wurden mit Hilfe von Ionenaustauschchromatographie auf CM-Zellulose, Gelfiltration auf Biogel P-2 (Fig. 11) und reversed-phase-HPLC (Fig. 12) weiter gereinigt und an Hand ihrer Aminosäurezusammensetzung charakterisiert. In allen untersuchten Fällen war die Aminosäurezusammensetzung des verhaltensaktiven Materials mit der von Oxytocin oder Lysin-vasopressin identisch. Das mit 90-60% Äthanol eluierte

F I G. 5

Extraktion von Gehirn- und Hypophysengewebe.

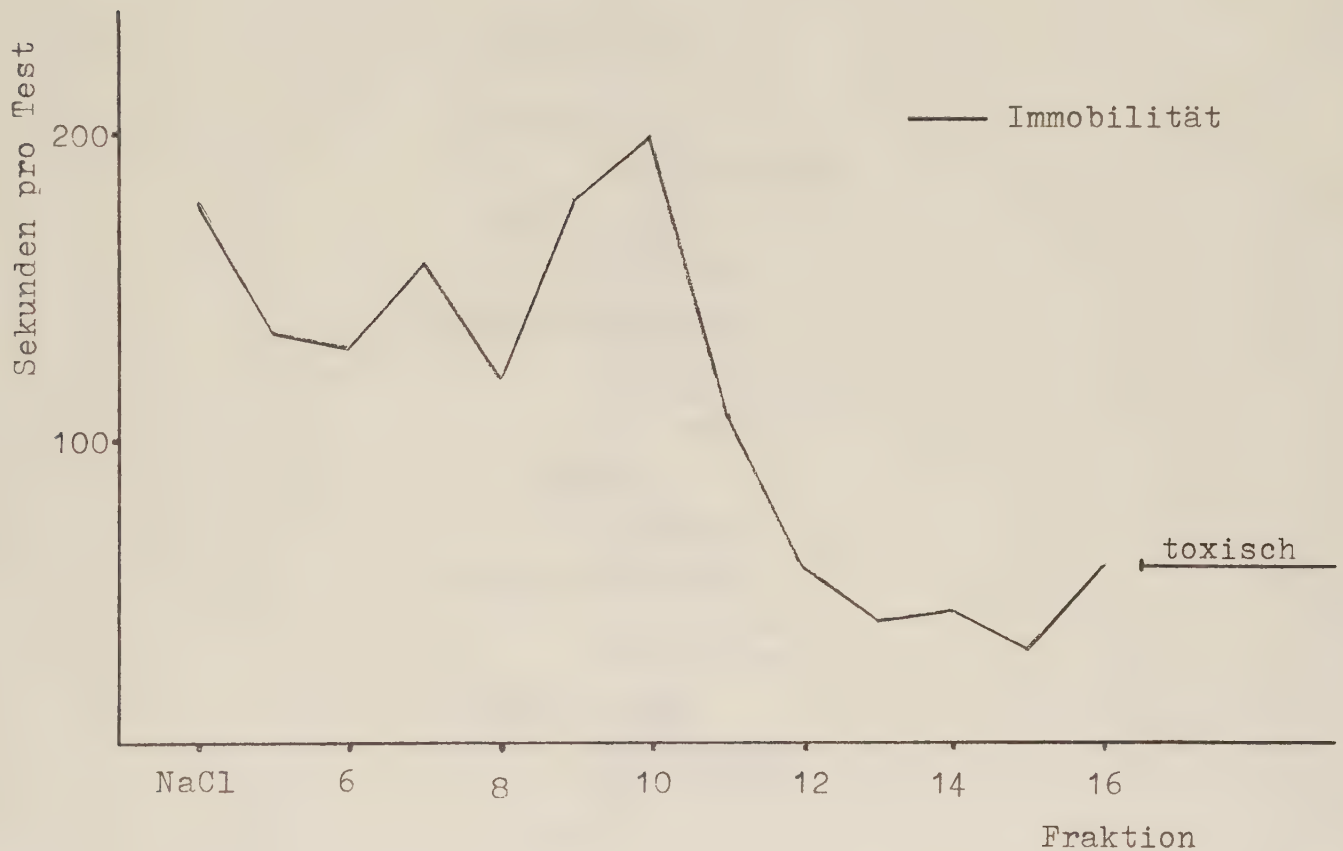


Material vom ersten Ansatz (Fig. 8) und das wenig gereinigte nicht basische Material vom zweiten Ansatz (Fig. 10) wurden nicht näher untersucht. Ob diese Pools andere Peptide mit ähnlichen Verhaltenseffekten enthalten oder ob die biologische Aktivität auch hier auf Oxytocin oder Vasopressin zurückzuführen ist, ist unbekannt.

Die weitere Reinigung der Peptide ist am Beispiel von Pool H = Fraktion 210 - 216 aus dem zweiten präparativen Ansatz (Fig. 10) gezeigt: Das Material dieses Pools wurde auf einer 1 x 108 cm -

F I G. 6

Wirkung eines auf Sephadex G-25 gereinigten Hypophysenextrakts auf das Verhalten im Schwimmtest.⁺



⁺ Extrakt aus 162g Hypophysen, Wirkung der 1 auf 10 konzentrierten 5ml-Fractionen.

F I G. 7

Erster präparativer Ansatz.

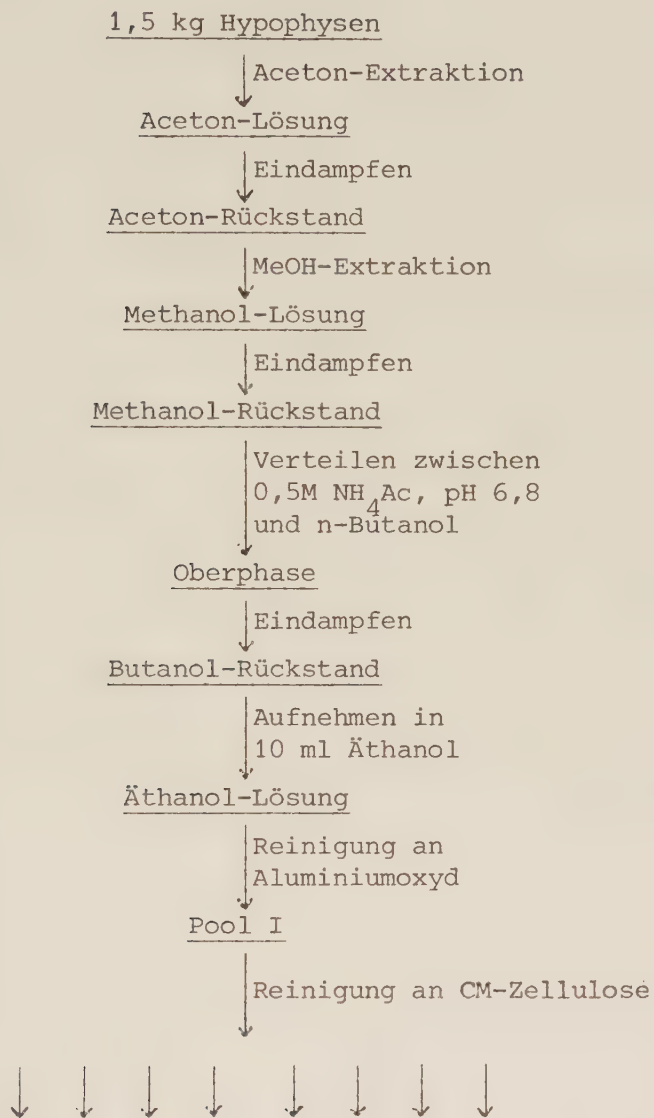
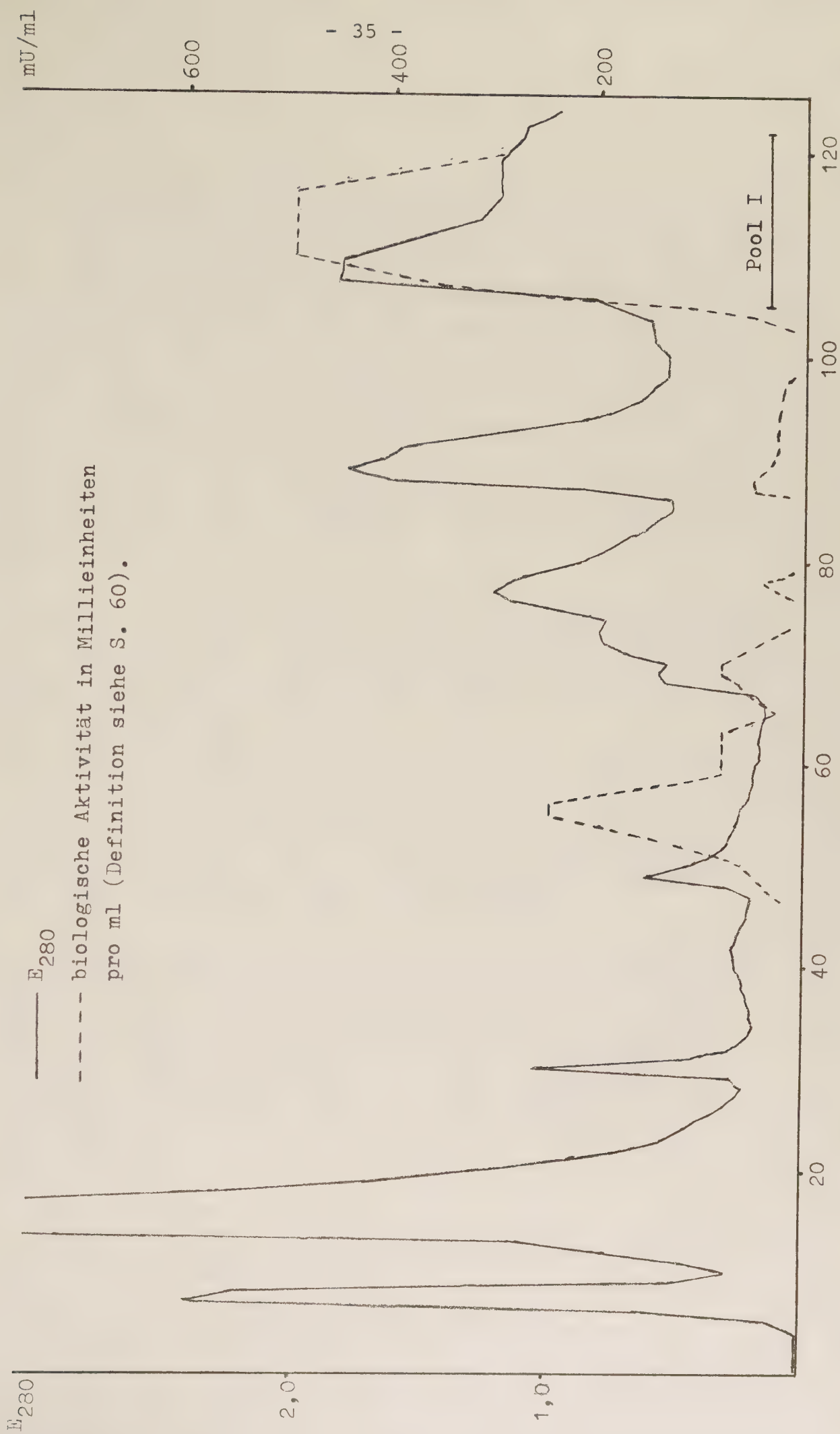


FIG. 8

Reinigung des Materials aus der ersten Präparation auf Aluminiumoxyd.
Elution mit steigenden Konzentrationen von Wasser in Äthanol.



Säule Biogel P-2 gereinigt (Fig. 11). Die Hauptmenge des biologisch wirksamen Materials befand sich in den Fraktionen 72 - 82. Aus diesen Fraktionen wurde der Pool H β gebildet. Das Material dieses Pools wurde mit reversed-phase-HPLC weiter gereinigt (Fig. 12). Dabei waren zwei große Peaks zu erkennen, die biologische Aktivität konnte nur in dem ersten Peak nachgewiesen werden, der sich von Fraktion 28 - 38 erstreckte. Die Aminosäurezusammensetzung dieses Peaks war folgendermaßen: Asp (Asn), Glu (Gln), Pro, Gly, Cys, Tyr, Phe, Lys. Dies entspricht der Aminosäurezusammensetzung von Lysin-vasopressin. Das Material wurde nicht weiter untersucht.

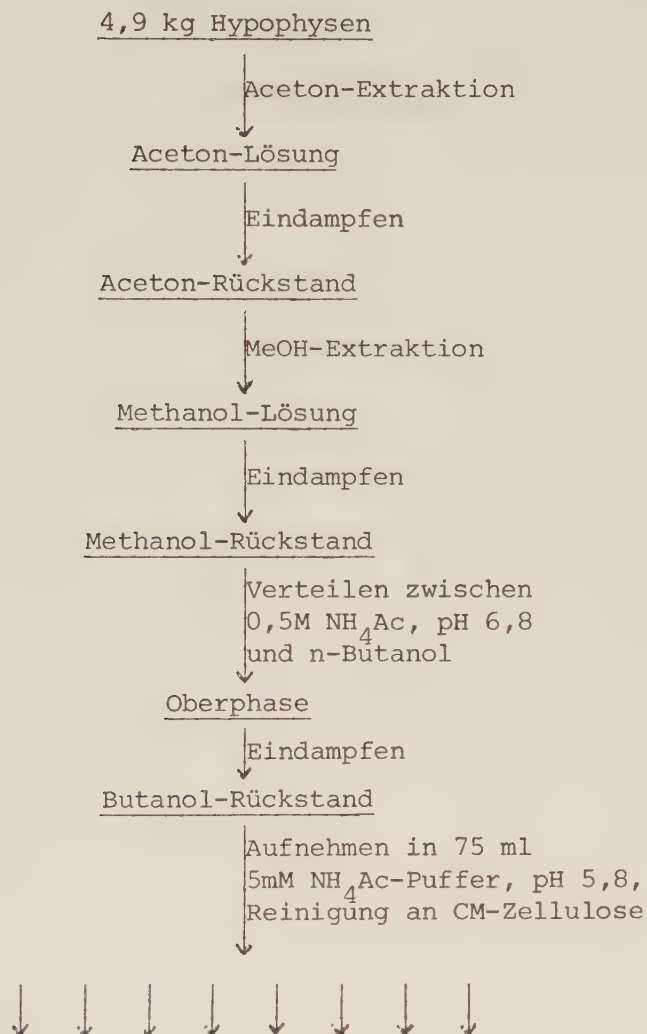
Das in den Verhaltenstests inaktive Material des zweiten Peaks (Fraktion 46 - 52) wurde ebenfalls einer Aminosäureanalyse unterworfen. Dabei wurde folgende Aminosäurezusammensetzung festgestellt:

Ser, Glu (Gln), Pro, Gly₍₂₎, Leu, Tyr, His, Arg.
Die Aminosäuresequenz dieses Peptids konnte zunächst nicht bestimmt werden. Nach einer Inkubation mit Pyroglutamyl-Aminopeptidase dagegen wurde folgende Sequenz bestimmt: His-Trp-Ser-Tyr-Gly-(Leu)-. Eine weitere Sequenzierung war wegen der zu geringen Mengen nicht möglich.

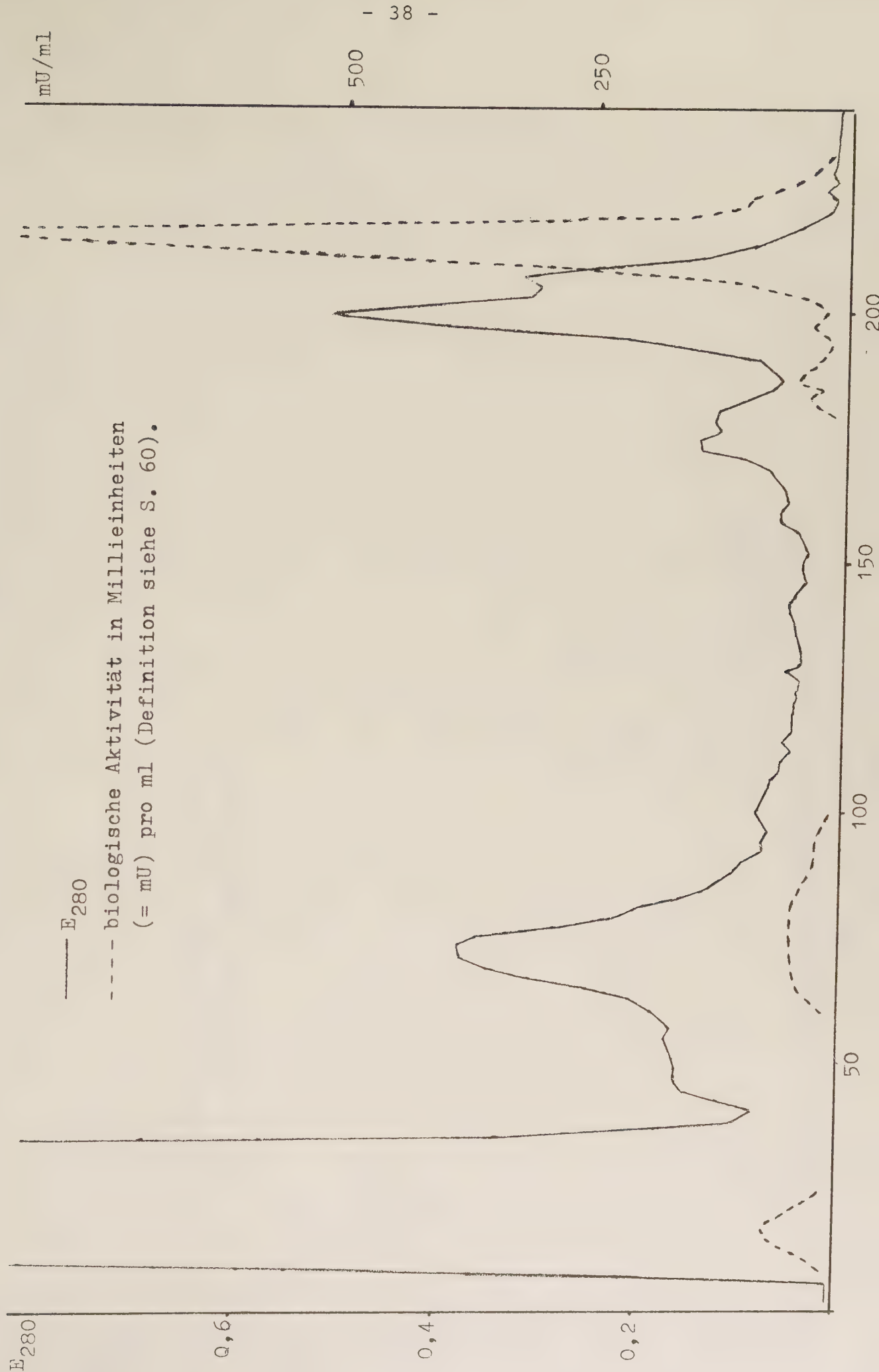
Bei dieser Sequenz handelt es sich um die auf den N-terminalen Pyroglutamylrest folgende Aminosäuresequenz von LHRH. Auch die Aminosäurezusammensetzung ist mit der von LHRH vereinbar: Tryptophan wird bei der sauren Hydrolyse abgebaut. LHRH wurde erstmals 1971 aus Hypothalamusgewebe von Schweinen isoliert und strukturell aufgeklärt (4,95, 129,130).

F I G. 9

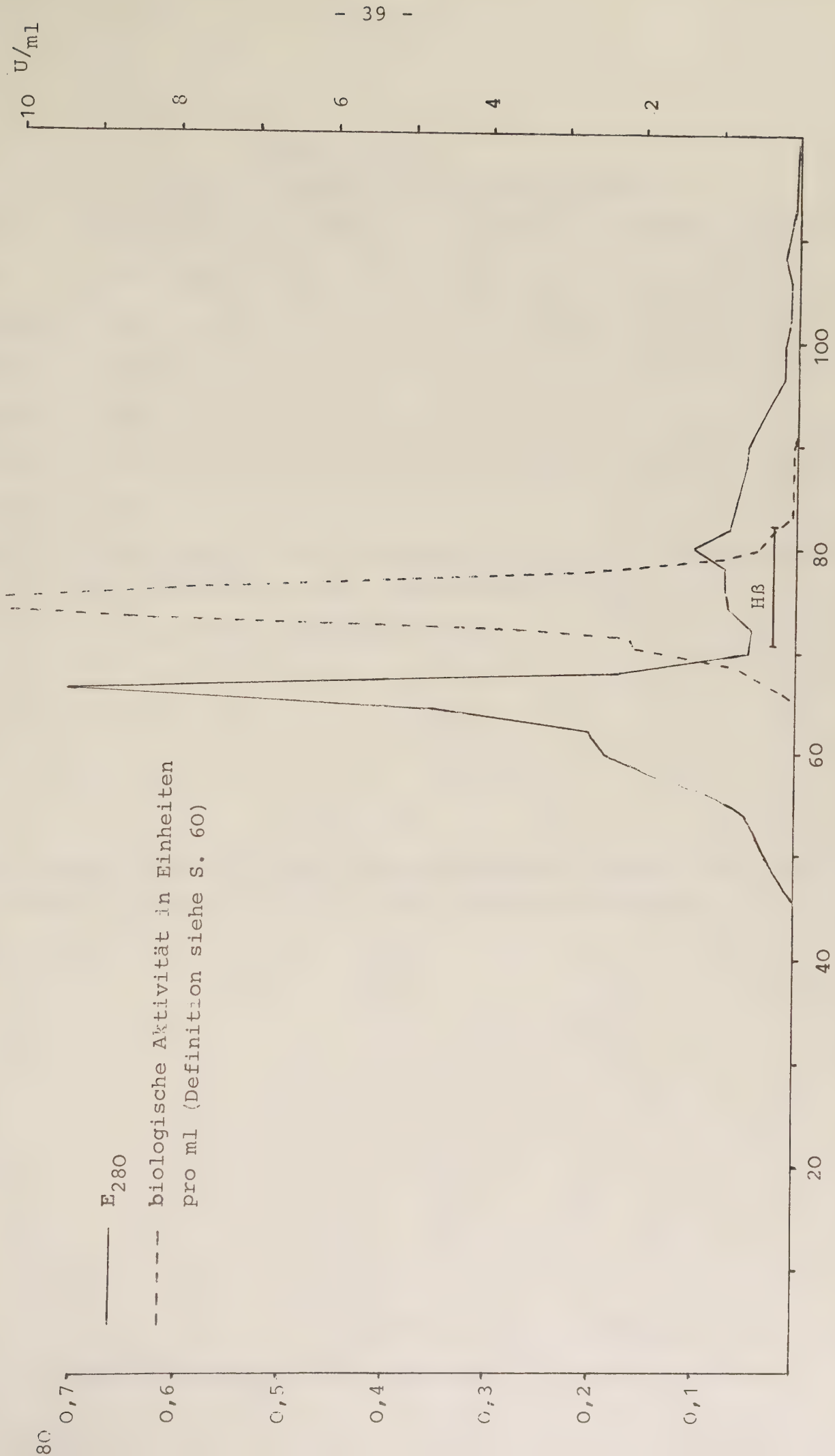
Zweiter präparativer Ansatz.



Reinigung des Materials der zweiten Präparation auf CM-Zellulose.



Reinigung des Materials von Fraktion 210-216 (= Pool H) aus dem CM-Z-Lauf der zweiten Präparation (Fig. 10) auf Biogel P-2.



T A B E L L E 15

Wirkungen von Hypophysenextrakten im Kratztest.

N ⁺	Injektion [†]	Immobilität	Putzen	Kratzen	Laufen	Aufrichten
11	NaCl	73,5 ± 22,2	9,2 ± 2,6	4,1 ± 3,7	40,6 ± 6,9	13,9 ± 2,5
10	Fr. 48 1/40	3,4 ± 1,0 ^{**}	27,6 ± 6,6 [*]	101,1 ± 17,2 ^{***}	46,9 ± 6,9	13,9 ± 2,7
9	Fr. 48 1/4	0,3 ± 0,1 ^{**}	96,8 ± 11,7 ^{***}	63,2 ± 13,6 ^{***}	53,0 ± 7,2	10,7 ± 1,7
10	Fr. 48-59 1/10	9,5 ± 3,5 [*]	41,8 ± 14,6 [*]	73,4 ± 12,2 ^{***}	41,0 ± 9,8	11,3 ± 1,7
10	Fr. 48-59 1x	1,0 ± 0,6 ^{**}	47,5 ± 7,9 ^{***}	136,9 ± 18,9 ^{***}	66,3 ± 6,4 [*]	15,3 ± 2,0

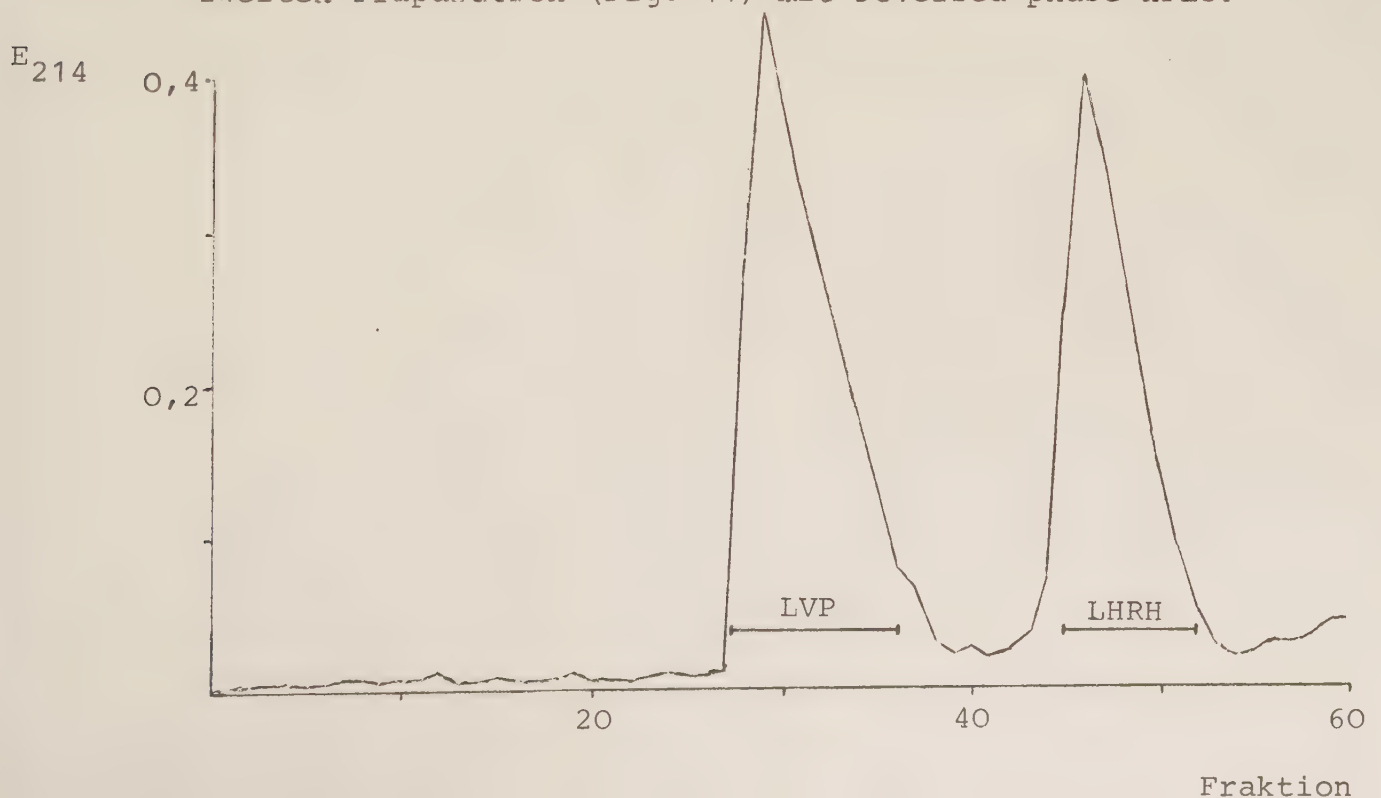
⁺ Zahl der Mäuse pro Gruppe.

[†] Fr. 48 = basisches Material aus der ersten Präparation (Fig. 8, Pool I nach CM-Z-Lauf).
Fr. 48-59 = nicht-basisches Material aus der ersten Präparation (Fig. 8).

* p < 0,1; ** p < 0,01; *** p < 0,001; Mann-Whitney's U-Test.

F I G. 12

Reinigung von Pool Hß = Fr. 72-82 aus dem Biogellauf von Pool H aus der zweiten Präparation (Fig. 11) mit reversed phase-HPLC.



T A B E L L E 16

Wirkungen von Hypophysenextrakten im Röhrentest.

N ⁺	Injektion ⁺	Verhalten ⁺⁺			
		Immobilität	Putzen	Kratzen	Fluchtverhalten
12	NaCl	182,1 ± 15,7	4,8 ± 1,7	0,2 ± 0,2	2,4 ± 1,3
8	Fr. <u>48</u> 1/40	155,3 ± 19,5	4,3 ± 1,4	0,9 ± 0,7	2,1 ± 0,8
8	Fr. <u>48</u> 1/4	91,5 ± 17,0 ^{**}	10,0 ± 5,7	6,3 ± 5,0	58,0 ± 15,0 ^{***}
8	Fr. <u>48-59</u> 1/10	138,3 ± 14,5 [*]	32,4 ± 7,3 ^{***}	2,0 ± 1,4	13,1 ± 10,2
8	Fr. <u>48-59</u> 1x	71,9 ± 20,8 ^{***}	15,4 ± 7,4	3,0 ± 2,9	59,6 ± 17,8 ^{***}
8	LVP 10ng	129,0 ± 13,8 [*]	9,6 ± 2,7	0,3 ± 0,3	36,1 ± 12,2 ^{**}
8	LVP 100ng	77,9 ± 4,9 ^{***}	7,0 ± 4,0	3,8 ± 3,8	88,5 ± 15,3 ^{***}

⁺ Zahl der Mäuse pro Gruppe.

⁺ Fr. 48 = basisches Material aus der ersten Präparation.

Fr. 48-59 = nicht-basisches Material aus der ersten Präparation.

LVP = Lysin-vasopressin, spezifische Aktivität = 100 I.U./mg.

⁺⁺ In Sekunden pro Test, Mittelwert ± S.E.M.

* p < 0,1; ** p < 0,01; *** p < 0,001; Mann-Whitney's U-Test.

IV. Pharmakologische Charakterisierung der Wirkungen von Hinterlappenhormonen.

1. Wirkungen nach subcutaner Injektion.

Zur Klärung der Frage, ob die Verhaltenseffekte Vasopressin-ähnlicher Peptide über einen zentralnervösen Mechanismus oder indirekt über Wirkungen an peripheren Organen vermittelt werden, wurden die Wirkungen subcutaner Injektionen mit denen nach intracerebroventrikulärer Injektion verglichen. Tabelle 17 zeigt, daß die subcutan applizierten Peptide die typischen Verhaltensänderungen nicht auslösen, selbst wenn die Dosierung 10.000fach über der minimalen wirksamen Dosis nach intracerebroventrikulärer Injektion liegt. Stattdessen ist eine aktivitätsmindernde Wirkung nachweisbar, die vermutlich indirekt über die starken kardiovaskulären Wirkungen dieser Peptide vermittelt wird. Bei gleichzeitiger subcutaner und intracerebroventrikulärer Injektion dominieren die zentralnervösen Wirkungen.

Dieser Versuch zeigt nicht nur, daß die charakteristischen Verhaltenseffekte über einen zentralnervösen Mechanismus vermittelt werden, sondern auch, daß die Peptide nach subcutaner Injektion den zentralnervösen Wirkungsort nicht in genügender Menge erreichen (Vergleiche Kap. V,3). Dies stimmt im wesentlichen mit einem früheren Bericht über Verhaltenseffekte Vasopressin-ähnlicher Peptide bei Mäusen überein (29).

Dagegen treten Wirkungen auf das Lernverhalten auch nach systemischer Verabreichung von Vasopressin und verwandten Peptiden auf (9,46,164). Derartige Wirkungen sind allerdings nicht unumstritten (67).

T A B E L L E 17

Wirkungen im Kratztest nach subcutaner Injektion
von Oxytocin und Lysin-vasopressin (LVP).

N ⁺	Injektion ⁺		Verhalten ⁺⁺	
	s.c.	i.c.	Immobilität	Putzen + Kratzen
10	NaCl		36,8 ± 23,4	33,1 ± 16,5
10	Oxy		282,4 ± 7,0 ^{***}	6,0 ± 6,0 [*]
10	LVP		288,7 ± 2,3 ^{***}	0,0 ± 0,0 [*]
10	NaCl	NaCl	219,3 ± 13,4	14,8 ± 6,9
10	Oxy	NaCl	267,5 ± 11,4 ^{**}	14,5 ± 10,8
10	LVP	NaCl	270,7 ± 5,5 ^{**}	0,4 ± 0,3 ^{**}
6	LVP	LVP	10,8 ± 7,0	260,5 ± 9,8

⁺ Zahl der Mäuse pro Gruppe.

⁺ s.c. = subcutan, LVP 5,5µg, Oxytocin 160µg pro Maus.

i.c. = intracerebroventrikulär, LVP 5ng pro Maus.

⁺⁺ In Sekunden pro Test, Mittelwert ± S.E.M.

^{*} p < 0,1; ^{**} p < 0,01; ^{***} p < 0,001; Mann-Whitney's U-Test.

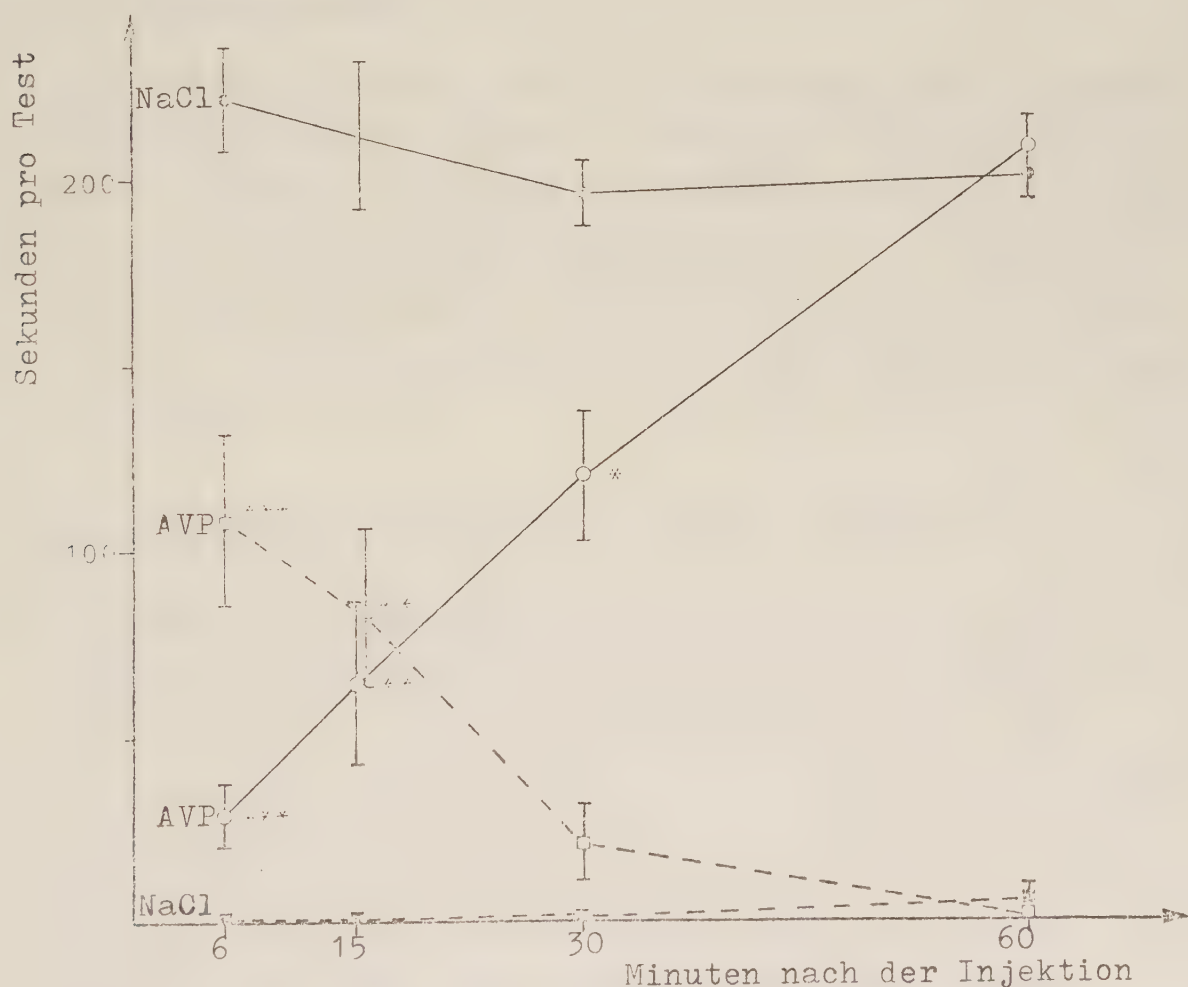
2. Zeitabhängigkeit.

Der zeitliche Verlauf der Verhaltenseffekte von Hinterlappenhormonen wurde im Röhrentest nach intracerebroventrikulärer Injektion von 100 Nanogramm Arginin-vasopressin untersucht. Fig. 13 zeigt, daß bei den eine Stunde nach der Injektion getesteten Mäusen keine Wirkung mehr nachweisbar war. Im Gegensatz dazu sind viele andere zentralnervöse Wirkungen von Vasopressin und verwandten Peptiden noch mehrere Stunden oder Tage nach der Behandlung nachweisbar. Hierzu

gehören Wirkungen auf das Vergessen bedingter Vermeidereaktionen (9,46,163,164), auf Puromycin-induzierte Amnesie (159), die Beeinflussung der Toleranzbildung gegen Morphin (125) und Äthanol (63,64) und intracraniale Selbststimulation (133,134,135).

F I G. 13

Zeitabhängigkeit der Vasopressinwirkung: Verhalten im Röhrentest nach Injektion von 100ng Arginin-vasopressin (AVP).



— Immobilität.
 - - - Fluchtverhalten.

* $p < 0,1$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Mann-Whitney's U-Test.

Der zeitliche Verlauf der Wirkungen erlaubt somit eine Differenzierung der in dieser Arbeit beschriebenen Verhaltenseffekte von anderen zentralnervösen Wirkungen der gleichen Peptide. Man kann von diesem Befund auf einen unterschiedlichen Wirkungsmechanismus schließen.

3. Toleranzbildung.

Eine Toleranzbildung, also eine Abschwächung der Wirksamkeit nach wiederholter Applikation, ist bei vielen pharmakologisch wirksamen Substanzen zu beobachten. Im Fall der akuten Verhaltenseffekte von Hinterlappenhormonen bei Mäusen wurde dagegen das Fehlen einer Toleranzbildung nach wiederholter intracerebroventrikulärer Injektion der Peptide berichtet (29). In den folgenden Experimenten wurde diese Frage näher untersucht.

a) Experimente mit akuter Vorbehandlung (Tachyphylaxie).

In dieser Versuchsreihe wurde untersucht, ob und unter welchen Bedingungen Kurzzeittoleranz gegen die Verhaltenseffekte der Hinterlappenhormone ausgelöst werden kann.

Tabelle 18 zeigt einen Versuch, der folgendermaßen durchgeführt wurde: Die Mäuse wurden 155 und 95 Minuten vor der Testinjektion mit je 5µg Lysin-vasopressin (LVP) oder Kochsalzlösung (NaCl) vorbehandelt. Die Testinjektion wurde mit NaCl oder mit 50 Nanogramm LVP durchgeführt. 5-11 Minuten nach der Testinjektion wurde der Röhrentest durchgeführt. In dieser Versuchsanordnung war bei den Mäusen, die als Testinjektion NaCl erhielten, keine Wirkung

T A B E L L E 18

Tachyphylaxie nach 2x5µg Lysin-vasopressin (LVP)
im Röhrentest.

N ⁺	Vorbehandlung ⁺	Testinjektion	Verhalten ⁺⁺	
			Immobilität	Fluchtverhalten
8	NaCl	NaCl	229,0 ± 5,1	3,6 ± 3,6
8	LVP 2x5µg	NaCl	199,0 ± 12,3 [*]	6,9 ± 5,9
12	NaCl	LVP 50ng	69,7 ± 14,4	126,2 ± 17,7
12	LVP 2x5µg	LVP 50ng	157,8 ± 11,4 ^{***}	39,9 ± 13,7 ^{***}

⁺ Zahl der Mäuse pro Gruppe.

⁺
⁺ Intracerebroventrikuläre Injektionen 155 und 95 Minuten vor der Testinjektion.

⁺⁺ In Sekunden pro Test, Mittelwert ± S.E.M.

^{*} p < 0,1; ^{***} p < 0,001; Mann-Whitney's U-Test.

T A B E L L E 19

Tachyphylaxie nach 2x200ng Lysin-vasopressin (LVP)
im Röhrentest.

N ⁺	Vorbehandlung ⁺	Testinjektion	Verhalten ⁺⁺	
			Immobilität	Fluchtverhalten
10	NaCl	NaCl	210,7 ± 13,1	20,8 ± 11,8
10	LVP 2x200ng	NaCl	193,3 ± 11,4	25,0 ± 8,4
10	NaCl	LVP 50ng	79,0 ± 20,1	141,4 ± 21,8
10	LVP 2x200ng	LVP 50ng	113,3 ± 14,0 [*]	108,6 ± 14,5 [*]

⁺ Zahl der Mäuse pro Gruppe.

⁺
⁺ Intracerebroventrikuläre Injektionen 85 und 50 Minuten vor der Testinjektion.

⁺⁺ In Sekunden pro Test, Mittelwert ± S.E.M.

^{*} p < 0,1; Mann-Whitney's U-Test.

T A B E L L E 20

Tachyphylaxie: Kreuztoleranz im Kratztest.

N ⁺	Vorbehandlung ⁺	Testinjektion	Verhalten ⁺⁺	
			Immobilität	Pu + Kr
10	NaCl	Oxytocin 100ng	50,3 ± 22,5	154,4 ± 22,3
9	LVP 2x2µg	Oxytocin 100ng	97,0 ± 20,8 [*]	96,1 ± 21,3 [*]

⁺ Zahl der Mäuse pro Gruppe.

⁺ Intracerebroventrikuläre Injektionen 155 und 95 Minuten vor der Testinjektion.

⁺⁺ In Sekunden pro Test, Mittelwert ± S.E.M. Pu + Kr = Putzen und Kratzen.

^{*} p < 0,1; Mann-Whitney's U-Test.

T A B E L L E 21

Tachyphylaxie: Kreuztoleranz im Röhrentest.

N ⁺	Vorbehandlung ⁺	Testinjektion	Verhalten ⁺⁺	
			Immobilität	Fluchtverhalten
10	NaCl	Oxytocin 1µg	56,6 ± 14,3	159,6 ± 12,8
10	LVP 2x2µg	Oxytocin 1µg	138,0 ± 19,9 ^{**}	60,6 ± 23,5 ^{**}

⁺ Zahl der Mäuse pro Gruppe.

⁺ Intracerebroventrikuläre Injektionen 155 und 95 Minuten vor der Testinjektion.
LVP = Lysin-vasopressin.

⁺⁺ In Sekunden pro Test, Mittelwert ± S.E.M.

^{**} p < 0,01; Mann-Whitney's U-Test.

T A B E L L E 22

Toleranz im Kratztest.

N ⁺	Vorbehandlung [†]	Testinjektion [§]	Verhalten ⁺⁺	
			Immobilität	Pu + Kr
9	NaCl	NaCl	102,2 ± 30,7	22,7 ± 6,3
9	AVT 2µg	NaCl	99,6 ± 21,8	14,1 ± 4,8
23	NaCl	AVT 5ng	20,5 ± 9,8	199,3 ± 13,8
10	AVT 200ng	AVT 5ng	144,7 ± 18,3 ^{***}	79,5 ± 22,9 ^{***}
13	AVT 2µg	AVT 5ng	88,5 ± 16,7 ^{***}	25,6 ± 9,1 ^{***}

⁺ Zahl der Mäuse pro Gruppe.

[†] 9 intracerebroventrikuläre Injektionen im Abstand von 10 - 14 Stunden.
AVT = Arginin-vasotocin.

[§] 5 - 8 Stunden nach der letzten Vorbehandlungsinjektion.

⁺⁺ In Sekunden pro Test, Mittelwert ± S.E.M.; Pu + Kr = Putzen und Kratzen.

^{***} p < 0,001; Mann-Whitney's U-Test.

T A B E L L E 23

Toleranz im Röhrentest.

N ⁺	Vorbehandlung [†]	Testinjektion [§]	Verhalten ⁺⁺	
			Immobilität	Fluchtverhalten
8	NaCl	NaCl	206,1 ± 6,9	2,4 ± 2,4
8	AVT 2µg	NaCl	206,6 ± 12,0	0,0 ± 12,0
21	NaCl	AVT 50ng	55,3 ± 9,4	141,5 ± 11,1
10	AVT 200ng	AVT 50ng	117,3 ± 7,5 ^{***}	65,8 ± 14,2 ^{***}
12	AVT 2µg	AVT 50ng	147,3 ± 9,3 ^{***}	47,4 ± 11,3 ^{***}

⁺ Zahl der Mäuse pro Gruppe.

[†] 11 intracerebroventrikuläre Injektionen im Abstand von 10 - 14 Stunden.

[§] 5 - 8 Stunden nach der letzten Vorbehandlungsinjektion.

⁺⁺ In Sekunden pro Test, Mittelwert ± S.E.M.

^{***} p < 0,001; Mann-Whitney's U-Test.

der LVP-Vorbehandlung auf die Verhaltensparameter nachweisbar. Die Wirkung der LVP-Injektion dagegen wurde durch die LVP-Vorbehandlung signifikant abgeschwächt, unter den Bedingungen dieses Experiments wurde also Kurzzeittoleranz induziert. Bei dem in Tabelle 19 gezeigten Experiment wurde mit zwei 200ng-Injektionen LVP 85 und 50 Minuten vor der Testinjektion vorbehandelt. 5-11 Minuten nach der Testinjektion wurde der Röhrentest durchgeführt. Unter diesen Bedingungen war nur eine geringe Toleranzbildung zu erkennen.

In Experimenten dieses Typs besteht Kreuztoleranz zwischen den verschiedenen Hinterlappenhormonen. Tabelle 20 und 21 zeigen die Wirkung von Oxytocin im Kratztest und im Röhrentest bei Mäusen, die mit $2 \times 2 \mu\text{g}$ LVP vorbehandelt wurden.

b) Experimente mit chronischer Vorbehandlung.

Bei diesen Versuchen wurden die Mäuse zweimal täglich im Abstand von je 10 bis 14 Stunden intracerebroventrikulär mit Kochsalzlösung oder dem Peptid behandelt. In den meisten Experimenten wurde nach 4 1/2 oder 5 1/2 Tagen, 5-8 Stunden nach der letzten Vorbehandlungsinjektion, die Testinjektion mit anschließendem Verhaltenstest durchgeführt.

In Tabelle 22 und 23 sind die Ergebnisse von zwei derartigen Versuchen gezeigt: Nach 9 bzw. 11 Vorbehandlungsinjektionen mit verschiedenen Dosierungen von Arginin-vasotocin (AVT) ließ sich Toleranzbildung nachweisen. Die Toleranz war bereits nach einer Vorbehandlung mit 9 bzw. 11 $\times 200\text{ng}$ AVT hoch signifikant. Sie trat in beiden Tests mit ähnlicher Intensität auf. Auch bei diesen Versuchen besteht Kreuztoleranz zwischen Oxytocin und Vasopressin (Tab. 24 und 25 und Fig. 14).

T A B E L L E 24

Kreuztoleranz im Kratztest.

N ⁺	Vorbehandlung ⁺	Testinjektion [§]	Verhalten ⁺⁺	
			Immobilität	Pu + Kr
8	NaCl	NaCl	147,8 ± 21,8	31,9 ± 10,1
8	LVP 2µg	NaCl	227,8 ± 21,9 ^{**}	15,9 ± 5,9
10	NaCl	Oxytocin 100ng	1,1 ± 1,1	209,1 ± 12,7
10	LVP 2µg	Oxytocin 100ng	140,3 ± 26,5 ^{***}	26,1 ± 6,7 ^{***}

⁺ Zahl der Mäuse pro Gruppe.

⁺
⁺ 9 intracerebroventrikuläre Injektionen im Abstand von 10 - 14 Stunden.

LVP = Lysin-vasopressin

[§] 5 - 8 Stunden nach der letzten Vorbehandlungsinjektion.

⁺⁺ In Sekunden pro Test, Mittelwert ± S.E.M.; Pu + Kr = Putzen und Kratzen.

^{**} p < 0,01; ^{***} p < 0,001; Mann-Whitney's U-Test.

T A B E L L E 25

Kreuztoleranz im Röhrentest.

N ⁺	Vorbehandlung ⁺	Testinjektion [§]	Verhalten ⁺⁺	
			Immobilität	Fluchtverhalten
8	NaCl	NaCl	201,0 ± 12,7	12,1 ± 12,1
8	LVP 2µg	NaCl	192,8 ± 11,4	0,4 ± 0,4
10	NaCl	Oxytocin 1µg	61,0 ± 10,0	131,4 ± 17,1
9	LVP 2µg	Oxytocin 1µg	136,1 ± 9,2 ^{***}	24,8 ± 10,6 ^{***}

⁺ Zahl der Mäuse pro Gruppe.

⁺
⁺ 11 intracerebroventrikuläre Injektionen im Abstand von 10 - 14 Stunden.

LVP = Lysin-vasopressin.

[§] 5 - 8 Stunden nach der letzten Vorbehandlungsinjektion.

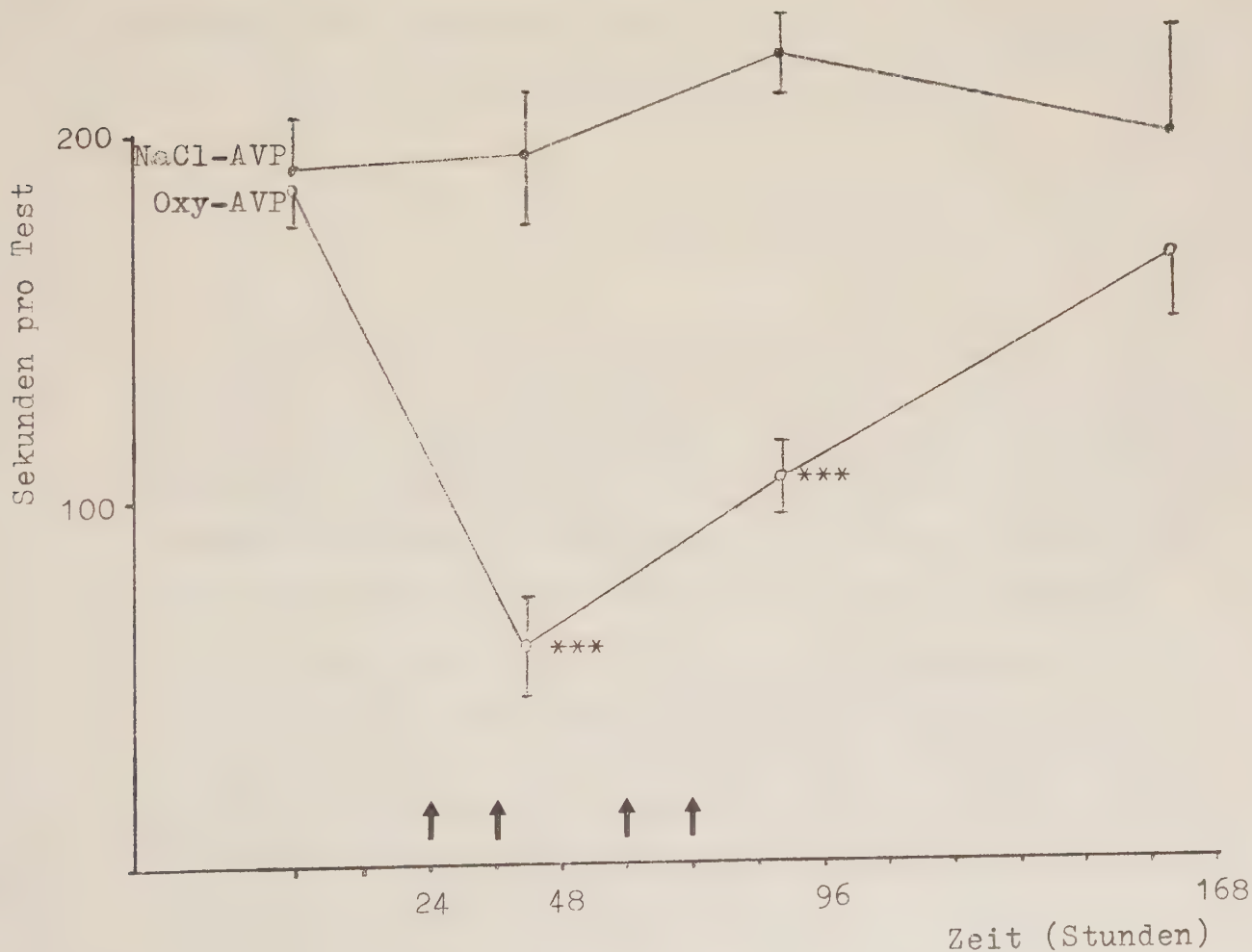
⁺⁺ In Sekunden pro Test, Mittelwert ± S.E.M.

^{***} p < 0,001; Mann-Whitney's U-Test.

Der zeitliche Verlauf der Toleranzbildung ist in Fig. 14 gezeigt: Die Toleranz, die während der Vorbehandlung mit zweimal täglich 8 μ g Oxytocin rasch einsetzt, ist innerhalb weniger Tage weitgehend oder vollständig reversibel. 8 μ g Oxytocin sind etwa das 500fache der minimalen wirksamen Dosis (ED₅₀) für die Auslösung von exzessivem Kratzen.

F I G. 14

Toleranzbildung gegenüber 5ng AVP bei Oxytocin-vorbehandelten Mäusen:
Werte für Putzen + Kratzen im Kratztest.



↑↑ Vorbehandlungsinjektionen mit je 8 μ g Oxytocin.

*** $p < 0,001$; Mann-Whitney's U-Test.

T A B E L L E 26

Toleranz im Kratztest nach Absetzen der Vorbehandlung.

N ⁺	Tage ⁺	Vorbehandlung [§]	Testinjektion	Verhalten ⁺⁺	
				Immobilität	Pu + Kr
9	4	NaCl	AVT 5ng	4,7 ± 1,8	218,4 ± 17,2
9	4	LVP 2µg	AVT 5ng	83,8 ± 34,3 ^{***}	102,2 ± 33,2 ^{**}
9	9	NaCl	AVT 5ng	3,6 ± 2,1	222,3 ± 20,1
9	9	LVP 2µg	AVT 5ng	29,6 ± 12,5 [*]	166,6 ± 18,8 [*]

⁺ Zahl der Mäuse pro Gruppe.

⁺⁺ Zeit nach dem Ende der 5 1/2 täglichen Vorbehandlungsphase.

[§] 11 intracerebroventrikuläre Injektionen im Abstand von 10 - 14 Stunden.

LVP = Lysin-vasopressin; AVT = Arginin-vasotocin.

⁺⁺ In Sekunden pro Test, Mittelwert ± S.E.M., Pu + Kr = Putzen und Kratzen.

^{*} p < 0,1; ^{**} p < 0,01; ^{***} p < 0,001; Mann-Whitney's U-Test.

Bei dem in Tabelle 26 gezeigten Experiment waren die Mäuse 5 1/2 Tage lang zweimal täglich mit je 2µg Lysin-vasopressin behandelt worden. Dies ist etwa das 3.600fache der ED₅₀ für die Auslösung von exzessivem Kratzen. Unter diesen extremen Bedingungen war die Toleranz noch 4 Tage nach dem Absetzen der Vorbehandlung stark ausgeprägt.

Zu berücksichtigen ist, daß Hinterlappenhormone die Toleranzbildung gegen zentralnervöse Wirkungen von Morphin (125) und Äthanol (63,64) beeinflussen. Diese Wirkungen werden wahrscheinlich unabhängig von den kurzfristigen Verhaltenseffekten über einen Mechanismus vermittelt, der mit den Wirkungen auf konditioniertes Verhalten (163,164) verwandt ist. Eine Wirkung von Oxytocin, Vasopressin und

T A B E L L E 27

Wirkungen von Bombesin bei oxytocintoleranten Mäusen.

N ⁺	Vorbehandlung ⁺	Testinjektion [§]	Verhalten ⁺⁺	
			Immobilität	Pu + Kr
11	NaCl	Bombesin 100ng	47,8 $\pm$ 10,1	191,8 $\pm$ 25,9
11	Oxytocin	Bombesin 100ng	68,1 $\pm$ 15,5	202,7 $\pm$ 30,0

⁺ Zahl der Mäuse pro Gruppe.

⁺
⁺ Die Mäuse wurden 3 Tage lang zweimal täglich mit NaCl oder 8µg Oxytocin i.c. behandelt.

[§] 5 - 8 Stunden nach der letzten Vorbehandlungsinjektion.

⁺⁺ In Sekunden pro Test, Mittelwert $\pm$ S.E.M., Pu + Kr = Putzen und Kratzen.

verwandten Peptiden auf die Toleranzbildung gegenüber ihren eigenen kurzfristigen Verhaltenseffekten ist daher möglich.

Zwischen den Hinterlappenhormonen und Bombesin, das nach intracerebroventrikulärer Injektion ebenfalls exzessives Putzen und Kratzen induziert, besteht keine Kreuztoleranz: Tabelle 27 zeigt, daß durch eine dreitägige Vorbehandlung mit 6x8µg Oxytocin die Wirkung von 100ng Bombesin auf das Verhalten der Mäuse nicht abgeschwächt wird. Unter diesen Bedingungen besteht gegenüber Vasopressin eine erhebliche Toleranz (Fig. 14). Dies zeigt, daß die durch Bombesin ausgelösten Verhaltensänderungen über einen anderen Mechanismus vermittelt werden als die Wirkungen der Hinterlappenhormone.

4. Interaktion mit pharmakologisch wirksamen Substanzen.

Die Interaktionen zwischen Hinterlappenhormonen und zentralnervös wirksamen Pharmaka wurden untersucht, um Hinweise auf den Wirkungsmechanismus der Peptide zu erhalten: Zum Beispiel lassen Interaktionen mit Substanzen, die durch eine selektive Wirkung auf einzelne Transmittersysteme gekennzeichnet sind, erkennen, welche Transmitter bzw. Transmitterrezeptoren für die Ausprägung der Wirkungen notwendig sind. Hierzu wurden die Pharmaka zusammen mit den Peptiden intracerebroventrikulär injiziert. Dieses Verfahren erlaubt eine Analyse der akuten Wechselwirkungen zwischen den verwendeten Substanzen. Störende Einflüsse durch periphere Wirkungen der untersuchten Drogen, zum Beispiel auf das vegetative Nervensystem, werden auf diese Weise reduziert.

Tabelle 28 zeigt die Wirkungen verschiedener zentralnervös wirksamer Substanzen allein und in Kombination mit 5 Nanogramm Arginin-vasotocin (AVT). Das Verhalten der Mäuse wurde im Kratztest analysiert.

Die Ergebnisse zeigen in vielen Fällen eine wenig charakteristische Überlagerung der Wirkungen des Peptids und der Droge. Beispiele hierfür sind Phentolamin und Propranolol, die adrenerge α - bzw. β -Rezeptoren blockieren. Auch Chlorpromazin, dessen neuroleptische Wirkung auf eine Blockierung von Dopaminrezeptoren zurückgeführt wird, antagonisiert die AVT-Wirkungen wenig. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Wirkungen von Catecholaminen, die über adrenerge α - oder β -Rezeptoren oder Dopaminrezeptoren vermittelt werden, für die Ausprägung der hier untersuchten Wirkungen von Hinterlappenhormonen nicht notwendig sind. Dagegen ist ACTH-induziertes Putzverhalten von intakten dopaminergen Systemen abhängig (168). Diese Ergebnisse

T A B E L L E 28

Interaktionen zwischen Arginin-vasotocin (AVT) und
zentralnervös wirksamen Substanzen im Kratztest.

Injektion ⁺	Immobilität	Putzen	Kratzen	Laufen	Aufrichten
NaCl	131,1 ± 14,7	27,4 ± 7,7	2,4 ± 1,2	28,7 ± 3,9	9,8 ± 1,6
AVT	24,9 ± 12,4	83,7 ± 12,8	79,8 ± 17,7	36,9 ± 9,4	10,1 ± 3,5
Propranolol 10µg	222,9 ± 24,5	15,9 ± 6,5	0,1 ± 0,1	13,3 ± 7,0	1,5 ± 0,9
Propranolol 10µg + AVT	20,8 ± 12,3	60,9 ± 12,6	125,3 ± 15,9 [*]	18,3 ± 6,7	2,6 ± 1,0
Propranolol 50µg	235,5 ± 19,5	6,5 ± 5,7	0,0 ± 0,0	20,5 ± 7,1	0,3 ± 0,3
Propranolol 50µg + AVT	49,6 ± 24,6	17,6 ± 11,4 ^{***}	26,1 ± 11,2 [*]	80,9 ± 19,8	1,6 ± 0,7
Phentolamin 5µg	255,1 ± 24,5	14,5 ± 10,6	4,4 ± 4,4	4,9 ± 2,9	0,5 ± 0,5
Phentolamin 5µg + AVT	40,9 ± 16,7 [*]	26,5 ± 7,2 ^{**}	173,5 ± 19,9 ^{**}	17,1 ± 5,8	0,1 ± 0,1
Phentolamin 25µg	297,2 ± 1,6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,7 ± 0,4	0,0 ± 0,0
Phentolamin 25µg + AVT	172,0 ± 29,9 ^{***}	56,4 ± 15,6 [*]	34,0 ± 13,4 [*]	8,0 ± 4,1	0,0 ± 0,0
Chlorpromazin 40µg	241,4 ± 14,9	2,6 ± 1,2	0,1 ± 0,1	9,9 ± 3,2	0,4 ± 0,3
Chlorpromazin 40µg + AVT	26,8 ± 14,8	20,6 ± 8,3 ^{***}	161,8 ± 25,4 [*]	24,6 ± 7,6	1,5 ± 0,8
Atropin 5µg	131,0 ± 35,8	7,7 ± 3,1	0,0 ± 0,0	48,8 ± 13,1	7,5 ± 2,2
Atropin 5µg + AVT	14,3 ± 6,1	61,1 ± 15,0	107,4 ± 15,6	28,9 ± 5,5	3,4 ± 1,1
Atropin 25µg	289,0 ± 7,3	0,4 ± 0,4	0,8 ± 0,6	3,6 ± 2,4	0,0 ± 0,0
Atropin 25µg + AVT	209,8 ± 27,0 ^{***}	8,6 ± 2,8 ^{***}	29,8 ± 10,8 [*]	15,8 ± 6,3	1,3 ± 1,3
Hexamethonium 10µg	140,0 ± 14,7	12,2 ± 4,2	0,7 ± 0,5	38,0 ± 7,3	2,5 ± 1,3
Hexamethonium 10µg + AVT	28,5 ± 8,6	26,3 ± 11,7 ^{**}	82,0 ± 18,2	47,3 ± 8,9	3,3 ± 1,2
Ergotamin 5µg	143,7 ± 15,2	7,2 ± 3,1	0,5 ± 0,4	26,8 ± 8,7	2,2 ± 1,0
Ergotamin 5µg + AVT	49,6 ± 14,8 [*]	6,6 ± 3,2 ^{***}	99,6 ± 16,9	36,6 ± 10,2	0,6 ± 0,3
DALA 1µg	233,0 ± 28,1	0,9 ± 0,6	0,3 ± 0,3	15,4 ± 10,2	0,0 ± 0,0
DALA 1µg + AVT	223,8 ± 24,0 ^{***}	0,5 ± 0,3 ^{***}	12,0 ± 4,9 ^{**}	10,3 ± 4,2	0,0 ± 0,0
Naloxon 10µg	135,3 ± 38,2	21,5 ± 17,6	1,5 ± 0,6	26,5 ± 8,2	6,7 ± 3,8
Naloxon 10µg + AVT	13,9 ± 6,3	74,3 ± 18,3	81,0 ± 21,4	30,6 ± 12,6	5,4 ± 3,6
Muscimol 50ng	116,3 ± 39,6	6,2 ± 2,0	2,2 ± 1,8	56,5 ± 18,5	7,2 ± 4,7
Muscimol 50ng + AVT	107,8 ± 22,8 ^{**}	16,6 ± 6,7 ^{***}	49,1 ± 18,7	28,5 ± 10,2	6,1 ± 2,7

T A B E L L E 28 (Fortsetzung)

Injektion [†]	Immobilität	Putzen	Kratzen	Laufen	Aufrichten
Glycin 25µg	242,3 ± 24,6	13,9 ± 7,2	0,0 ± 0,0	56,5 ± 18,5	7,2 ± 4,7
Glycin 25µg + AVT	67,1 ± 32,7 [*]	28,4 ± 7,5 ^{**}	112,0 ± 19,2	23,6 ± 7,0	2,8 ± 1,5
Mescaline 4µg	99,8 ± 36,7	6,8 ± 5,2	71,8 ± 23,6	32,5 ± 8,5	2,3 ± 1,0
Mescaline 4µg + AVT	10,2 ± 4,5	18,7 ± 11,5 ^{**}	167,3 ± 29,2 [*]	30,5 ± 6,1	3,7 ± 2,0
Mescaline 20µg	196,7 ± 47,4	0,3 ± 0,3	54,2 ± 34,3	17,3 ± 14,2	0,8 ± 0,8
Mescaline 20µg + AVT	128,3 ± 50,4 ^{**}	1,3 ± 0,4 ^{***}	128,5 ± 44,9	10,2 ± 2,6	0,0 ± 0,0
MDA 6µg	156,7 ± 28,8	3,0 ± 1,3	0,0 ± 0,0	32,5 ± 10,5	1,3 ± 0,6
MDA 6µg + AVT	98,0 ± 24,9 ^{***}	4,9 ± 2,2 ^{***}	66,0 ± 16,5	31,8 ± 7,5	2,4 ± 0,7
MDA 30µg	171,3 ± 47,7	0,5 ± 0,5	0,0 ± 0,0	70,0 ± 34,0	2,8 ± 2,3
MDA 30µg + AVT	135,3 ± 25,5 ^{***}	0,2 ± 0,2 ^{***}	13,0 ± 8,4 ^{**}	43,0 ± 13,2	1,0 ± 0,5
MDA 150µg	99,0 ± 31,4	0,2 ± 0,2	0,0 ± 0,0	49,8 ± 22,5	3,7 ± 3,5
MDA 150µg + AVT	146,2 ± 31,1 ^{***}	0,7 ± 0,4 ^{***}	0,0 ± 0,0 ^{***}	37,2 ± 16,5	1,0 ± 1,0
Amphetamin 100µg	250,2 ± 20,5	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	11,2 ± 4,0	0,2 ± 0,2
Amphetamin 100µg + AVT	165,9 ± 36,8 ^{***}	0,0 ± 0,0 ^{***}	7,6 ± 7,6 ^{***}	31,9 ± 17,2	0,0 ± 0,0
TRH 10µg	139,2 ± 50,4	9,5 ± 8,1	0,2 ± 0,2	45,8 ± 21,1	6,2 ± 3,8
TRH 10µg + AVT	117,3 ± 35,2 ^{**}	18,5 ± 5,7 ^{***}	3,9 ± 2,6 ^{***}	40,3 ± 12,3	1,5 ± 0,7
Substanz P 10µg	125,8 ± 45,4	31,3 ± 9,4	5,0 ± 2,6	55,7 ± 26,4	12,2 ± 7,8
Substanz P 10µg + AVT	2,8 ± 1,5 [*]	135,5 ± 17,0 [*]	62,9 ± 12,4	37,8 ± 10,5	6,9 ± 3,2
Neurotensin 1µg	295,5 ± 1,9	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Neurotensin 1µg + AVT	245,5 ± 14,4 ^{***}	1,3 ± 0,8 ^{***}	32,6 ± 11,0 [*]	3,1 ± 2,5	0,5 ± 0,4
Bradykinin 10µg	202,5 ± 25,4	6,8 ± 3,4	0,0 ± 0,0	21,7 ± 6,9	3,1 ± 1,4
Bradykinin 10µg + AVT	36,3 ± 14,2	54,8 ± 16,2 [*]	91,0 ± 20,4	20,6 ± 8,6	4,5 ± 2,3

Zahl der Mäuse pro Gruppe.

Intracerebroventrikuläre Injektionen, AVT-Dosis = 5ng/Maus.

MDA = DL-3,4-Methylenedioxyamphetamin, DALA = 2-D-Ala-met-enkephalinamid.

^{*}p < 0,1; ^{**}p < 0,01; ^{***}p < 0,001; verglichen mit AVT-injizierten Mäusen.

sprechen gegen die Annahme, daß die Vasopressin-induzierten Erhöhungen des Catecholaminsatzes, die in einzelnen Gehirnregionen beobachtet wurden (84,85,147), für die kurzfristigen Verhaltenseffekte relevant sind. Eine ebenfalls beobachtete praesynaptische Stimulierung des nigrostriatalen Dopaminsystems (132) scheint für die kurzfristigen Verhaltensänderungen ebenfalls nicht ursächlich zu sein. Bei cholinergen Mechanismen waren die Ergebnisse ähnlich: Weder Atropin noch Hexamethonium, durch die Muscarin- bzw. Nicotinrezeptoren blockiert werden, zeigten einen spezifischen Antagonismus der AVT-Wirkungen. Auch der inhibitorische Transmitter Glycin war wenig wirksam.

Amphetamin unterdrückte die AVT-Wirkungen fast vollständig. Das Gleiche gilt für MDA = DL-3,4-Methylenedioxyamphetamin. Hierbei handelt es sich um eine stark psychotrope Droge, die beim Menschen emotionale Prozesse intensiviert, während Amphetamin-ähnliche und halluzinogene Wirkungen schwach ausgeprägt sind (100). Selbst in hoher Dosierung beeinflusste MDA allein das Verhalten der Versuchstiere nur wenig.

Auch das Endorphinderivat 2-D-Ala-met-enkephalinamid, das starke, über Opiatrezeptoren vermittelte zentralnervöse Wirkungen auslöst (111), schwächte die Wirkung von AVT stark ab. Die Wirkung endogener Endorphine scheint dagegen keine Rolle zu spielen: Durch Naloxon, das die Opiatrezeptoren blockiert, wurden die AVT-Wirkungen nicht potenziert. Muscimol, ein GABA-Agonist mit halluzinogenen Eigenschaften, wirkte in der gleichen Richtung wie das Endorphin, allerdings schwächer. Ein starker Antagonismus der AVT-Wirkungen war bei TRH zu beobachten; der durch TRH induzierte Tremor wurde durch AVT nicht antagonisiert. Substanz P und Bradykinin antagonisierten die AVT-Wirkung nicht. Bei Neurotensin und AVT war eine wenig charakteristische Überlagerung der Wirkungen beider Peptide festzustellen.

T A B E L L E 29

Interaktionen zwischen Arginin-vasotocin (AVT) und
zentralnervös wirksamen Substanzen im Röhrentest.

N	Injektion ⁺	Immobilität	Putzen	Kratzen	Fluchtverhalten
22	NaCl	211,8 ± 5,4	5,4 ± 1,3	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1
22	AVT	34,3 ± 6,8	19,7 ± 4,7	8,5 ± 3,3	88,4 ± 12,9
6	Propranolol 50µg	204,7 ± 23,0	3,7 ± 2,1	0,0 ± 0,0	23,8 ± 23,8
8	Propranolol 50µg + AVT	87,8 ± 24,7 [*]	0,0 ± 0,0	5,5 ± 5,1	67,6 ± 15,7
6	Phentolamin 25µg	224,7 ± 8,4	1,5 ± 1,0	0,0 ± 0,0	1,2 ± 1,2
8	Phentolamin 25µg + AVT	111,4 ± 21,2 ^{**}	9,1 ± 5,0	5,3 ± 5,1	63,3 ± 18,7
6	Chlorpromazin 40µg	222,0 ± 8,8	1,3 ± 0,9	0,0 ± 0,0	7,0 ± 7,0
8	Chlorpromazin 40µg + AVT	33,4 ± 18,9	11,0 ± 9,8	12,6 ± 4,6	74,5 ± 18,4
6	Atropin 25µg	240,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
8	Atropin 25µg + AVT	124,3 ± 28,6 ^{**}	0,5 ± 0,4	6,9 ± 5,2	58,5 ± 21,4
6	DALA 1µg	240,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
8	DALA 1µg + AVT	188,8 ± 17,0 ^{***}	0,0 ± 0,0	0,9 ± 0,7	11,0 ± 6,7 ^{***}
6	Naloxon 10µg	215,0 ± 13,1	6,8 ± 3,0	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,3
8	Naloxon 10µg + AVT	32,4 ± 12,0	5,5 ± 2,6	10,8 ± 0,8	105,6 ± 14,9
6	Muscimol 50ng	213,5 ± 16,9	0,7 ± 0,5	0,0 ± 0,0	12,7 ± 12,7
8	Muscimol 50ng + AVT	43,8 ± 29,6	7,3 ± 3,4	4,9 ± 2,8	97,4 ± 30,1
6	Mescaline 20µg	229,2 ± 10,6	0,7 ± 0,7	0,0 ± 0,0	9,2 ± 9,2
8	Mescaline 20µg + AVT	153,3 ± 26,4 ^{***}	7,1 ± 3,1	10,8 ± 4,9	8,5 ± 3,8 ^{***}
6	MDA 30µg	157,8 ± 16,8	1,0 ± 0,6	0,0 ± 0,0	5,2 ± 4,8
8	MDA 30µg + AVT	39,3 ± 15,4	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	152,1 ± 22,4 [*]
6	Amphetamin 100µg	157,2 ± 18,8	0,5 ± 0,5	0,0 ± 0,0	19,0 ± 13,1
7	Amphetamin 100µg + AVT	70,3 ± 24,1 [*]	2,7 ± 1,8	7,6 ± 4,1	113,1 ± 34,8
6	TRH 10µg	201,3 ± 14,6	0,7 ± 0,4	0,0 ± 0,0	15,0 ± 8,2
8	TRH 10µg + AVT	137,5 ± 19,2 ^{***}	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	72,4 ± 23,0

⁺ Intracerebroventrikuläre Injektionen, AVT-Dosis = 50ng/Maus.

MDA = DL-3,4-Methylendioxyamphetamin, DALA = 2-D-Ala-met-enkephalinamid.

* p < 0,1; ** p < 0,01; *** p < 0,001; verglichen mit AVT-injizierten Mäusen.

Im Röhrentest sehen die Ergebnisse anders aus (Tab. 29): MDA und Amphetamin unterdrückten die typischen Wirkungen von AVT nicht. Das zeigt, daß diese Substanzen die AVT-Wirkungen im Kratztest nur funktionell antagonisieren. Ein intrinsischer, also an den die AVT-Wirkungen vermittelnden Rezeptoren ansetzender Antagonismus liegt offenbar nicht vor. Auch bei TRH war kein Antagonismus zum AVT-induzierten Fluchtverhalten nachweisbar. Nur das Endorphinderivat zeigte ähnliche Wirkungen wie im Kratztest. Auch Mescaline antagonisierte in diesem Test die AVT-Wirkungen. Bei Phentolamin, Propranolol, Chlorpromazin, Atropin und Muscimol war keine spezifische Interaktion nachweisbar.

Mit der möglichen Ausnahme von TRH handelt es sich bei den Substanzen, die AVT-Wirkungen antagonisieren, um stark psychotrope Drogen, die beim Menschen ausgeprägte "produktive" Symptome wie Euphorie, Halluzinationen oder eine Intensivierung emotionaler Prozesse auslösen. Es ist daher denkbar, daß der Antagonismus von durch Hinterlappenhormone ausgelösten Verhaltensänderungen als empirischer Screeningtest für derartige Drogenwirkungen verwendbar ist.

Vasokonstriktorische Substanzen wie Ergotamin, Amphetamin und Angiotensin II lösten keine Verhaltensänderungen aus, die mit denen Vasopressin-ähnlicher Peptide vergleichbar sind. Vasodilatorisch wirksame Substanzen wie Bradykinin, Substanz P und Neurotensin zeigten keinen spezifischen Antagonismus der AVT-Wirkungen. Dies deutet darauf hin, daß die Verhaltenseffekte der Hinterlappenhormone unabhängig von ihren vasokonstriktorischen Eigenschaften auftreten.

V. Synthetische Analoga von Hinterlappenhormonen.

1. Die Aktivitätseinheit.

Um die verhaltensändernden Wirkungen der Hinterlappenhormone und ihrer Analoga zu quantifizieren, erwies sich die Definition einer Aktivitätseinheit als zweckmäßig. Hierfür wurde eine Kurzform des "Mäusekratztests" verwendet, in der auf die Quantifizierung der Verhaltensweisen weitgehend verzichtet wurde:

Es wurde die Dosis bestimmt, die bei 50% der Mäuse in der Zeit von 2-5 Minuten nach der Injektion exzessives Kratzen auslöst (= ED₅₀). Exzessives Kratzen liegt definitionsgemäß dann vor, wenn das Tier sich während dieser Zeit mindestens 10 Sekunden kratzt. Die Dosisabhängigkeit dieses Parameters (Tab. 30) erlaubt eine ausreichend genaue Bestimmung der ED₅₀. Daraus wurde die biologische Aktivitätseinheit definiert:

Eine Einheit hat die Menge eines Peptids, die dem 10.000fachen der ED₅₀ entspricht.

Daraus ergeben sich die Einheiten pro Milligramm eines Peptids:

$$\text{Einheiten/mg} = \frac{100\text{ng}}{\text{ED}_{50}}$$

Diese Definition ergibt Werte, die in der gleichen Größenordnung liegen wie die für die hormonalen Wirkungen dieser Peptide definierten Aktivitätseinheiten.

Zur Bestimmung der verhaltensändernden Aktivität wurden verschiedene Verdünnungen der Peptide an je etwa 10 Mäusen getestet.

T A B E L L E 30

Dosisabhängigkeit von exzessivem Kratzen.

N ⁺	Behandlung	Dosis	exz. Kr. ⁺
15	NaCl		0
13	Oxytocin	10ng	1
12		15ng	2
9		20ng	9 ^{***}
12		50ng	10 ^{***}
10	Lysin-vasopressin	0,2ng	0
12		0,4ng	2
12		1ng	10 ^{***}
11		2ng	10 ^{***}

⁺ Zahl der Mäuse pro Gruppe.

⁺ Zahl der Mäuse, die sich 2-5 Minuten nach der Injektion mindestens 10 Sekunden lang kratzen.

^{***} $p < 0,001$; Fisher-Yates-Test.

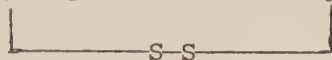
2. Struktur-Aktivitäts-Beziehungen.

Die Hormone des Hypophysenhinterlappens und ihre Analoga üben starke Wirkungen auf periphere Organe aus. Für diese Wirkungen sind Aktivitätseinheiten definiert. Der Vergleich der verhaltensändernden Potenz der Peptide mit den Wirkungen an peripheren Organen erlaubt Rückschlüsse auf die Natur des Rezeptors, der die Verhaltenseffekte vermittelt und damit auf den zugrundeliegenden Wirkungsmechanismus.

F I G. 15

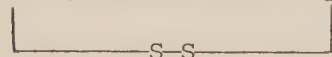
Formeln einiger Hinterlappenhormone und Analoga.

Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH₂



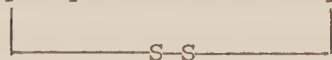
Arginin-vasopressin

Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH₂



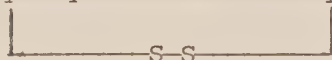
Arginin-vasotocin

Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH₂



Oxytocin

Cys-Tyr-Ile-Ser-Asn-Cys-Pro-Ile-Gly-NH₂



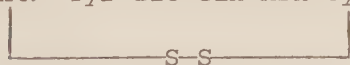
Isotocin

Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Lys



Desglycinamid-lysin-vasopressin

MPR⁺-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-N(CH₃)₂



1-Deamino-oxytocinsäuredimethylamid

⁺ MPR- = β-Mercaptopropionyl-

Tabelle 31 zeigt die verhaltensändernde Potenz der verwendeten Peptide neben den peripheren Wirkungen: Die Daten zeigen, daß die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen für die verhaltensändernde Wirkung große Ähnlichkeit mit der blutdrucksteigernden Wirkung bei Ratten zeigen. Einige Ausnahmen konnten jedoch gefunden werden: Die 7-Glycin-Analoga von Oxytocin und Deamino-oxytocin (Nr. 30 und 31 in Tabelle 31) verursachten selbst bei hoher Dosierung keine Verhaltensänderungen, obwohl sie eine gewisse blutdrucksteigernde Wirkung besitzen (160). Das Gleiche gilt für Isotocin (27), das als Hypophysenhormon bei einigen Fischen vorkommt (57). Auch 2-Phenylalanin-lysin-vasopressin (10) war viel weniger aktiv als auf Grund seiner starken blutdrucksteigernden Wirkung zu erwarten war. Val-asp-arginin-vasopressin (6) und Ala-gly-arginin-vasopressin (7) sind aus Rinderhypophysen isolierte Speicherformen von Arginin-vasopressin mit salvretischen Eigenschaften. Die klassischen hormonalen Wirkungen der Hinterlappenhormone sind bei diesen Peptiden schwach ausgeprägt (53).

Bei Analoga, bei denen das Verhältnis von Antidiurese zu Blutdrucksteigerung hoch war, ähnelte die verhaltensändernde Wirkung im allgemeinen der Wirkung auf den Blutdruck. Eine Dissoziation von blutdrucksteigernder und verhaltensändernder Wirkung scheint bei Peptiden mit einem hohen Verhältnis von Blutdrucksteigerung/Antidiurese wahrscheinlicher zu sein. Dies ist bei 2-Phenylalanin-lysin-vasopressin (10) und den 7-Glycin-Analoga von Oxytocin und Deamino-oxytocin (30 und 31) der Fall.

Kein Analogon hatte eine höhere verhaltensändernde Aktivität als die natürlich vorkommenden Vasopressine und Vasotocin. Es war auch schwierig, Analoga mit erhöhter Selektivität für die verhaltensändernde Wirkung zu finden: Die höchsten Verhältnisse von Verhaltensänderung/Blutdrucksteigerung waren, verglichen mit Lysin-vasopressin, 4,1 bei [5-(N⁴,N⁴-Dimethylasparagin),8-lysin]vasopressin

Biologische Wirkungen synthetischer Peptidanaloga.

	Peptid	Maus		Ratte		Vogel		Ratte	
		Verhalten ⁺	Antidiurese ⁺	Blutdruck ⁺	Blutdruck ⁺	Blutdruck ⁺	Uteruskontraktion ⁺	Uteruskontraktion ⁺	Uteruskontraktion ⁺
<u>1</u>	Arginin-vasopressin	220	503 (98)	487 (98)	100 (98)	12 (98)			
<u>2</u>	Lysin-vasopressin	180	203 (82)	243 (82)	48 (82)	4,8 (82)			
<u>3</u>	Arginin-vasotocin	180	195 (39)	245 (39)	150 (11)	125 (39)			
<u>4</u>	Desglycinamid-lysin-vasopressin	<2,0	2,4 (159)	0,05 (159)	inhib. (159)	0,22 (159)			
<u>5</u>	1-Deamino-lysin-vasopressin	110	301 (82)	126 (82)	48 (82)	12 (82)			
<u>6</u>	Val-asp-arginin-vasopressin	<0,01	-	-	-	-			
<u>7</u>	Ala-gly-arginin-vasopressin	19	-	-	-	-			
<u>8</u>	[2-(O-Methyl)tyrosin, 8-arg] vasopressin	19	386 (72)	9,7 (72)	-	inhib. (72)			
<u>9</u>	N-Acetyl-[2-(O-methyl)tyrosin, 8-arg] vasopressin	inhib.	0,026 (72)	inhib.	-	inhib. (72)			
<u>10</u>	[2-Phe, 8-lys] vasopressin	2,1		pA ₂ =7,18 50-60 (97)	0,5 (97)	<0,1 (97)			
<u>11</u>	1-Deamino [2-ile, 8-lys] vasopressin	1,5	21 (10)	57 (10)	0,15 (10)	0,3 (10)			
<u>12</u>	[4-Leu, 8-lys] vasopressin	1,3	3,0 (60)	1,5 (60)	1,0 (60)	<0,1 (60)			
<u>13</u>	[4-N ⁵ , N ⁵ -Dimethylglutamin, 8-lys] vasopressin	0,65	1-2 (38)	1,33 (38)	inhib. (38)	inhib. (38)			
<u>14</u>	[4-Aminobuttersäure, 8-arg] vasopressin	14	1,88 (139)	1,27 (139)	<0,1 (139)	<0,05 (139)			
<u>15</u>	1-Deamino [4-aminobuttersäure, 8-arg] vasopressin	3,6	760 (51)	38 (51)	25 (51)	5 (51)			
<u>16</u>	1-Deamino [4-aminobuttersäure, 8-lys] vasopressin	2,9	1020 (51)	10,7 (51)	9,9 (51)	3,3 (51)			
			729 (50)	3,5 (50)	12,6 (50)	1,51 (50)			

Peptid	Maus Verhalten ⁺	Ratte Antidiurese ⁺	Ratte Blutdruck ⁺	Vogel Blutdruck ⁺	Ratte Uteruskontraktion ⁺
17 [5-(N ⁴ ,N ⁴ -Dimethylasparagin),8-lys]vasopressin	7,7	5,5 (136)	2,55 (136)	0,39 (136)	0,05 (136)
18 1-Deamino[5-ala,8-lys]vasopressin	0,008	0,05 (50)	0,015 (50)	< 0,01 (50)	< 0,002 (50)
19 [7-(3,4-dehydroprolin),8-arg]vasopressin	180	1260 (13)	255 (13)	40,6 (13)	76,9 (13)
20 1-Deamino[7-(3,4-dehydroprolin),8-arg]vasopressin	100	4134 (13)	240 (13)	345 (13)	69 (13)
21 [2-Phe,7-(3,4-dehydroprolin),8-arg]vasopressin	40	1541 (13)	63,8 (13)	4,2 (13)	0,8 (13)
22 1-Deamino[2-phe,7-(3,4-dehydroprolin),8-arg] vasopressin	7,3	13000 (13)	-	2,9 (13)	6,0 (13)
23 Oxytocin	6,8	2,7 (20)	3,1 (20)	507 (20)	546 (21)
24 1-Deamino-oxytocin	1,1	19 (44)	1,44 (44)	975 (44)	803 (44)
25 1-Deamino[8-ala]oxyressin	2,0	-	4,6 (18)	47 (18)	25 (18)
26 [4-Val]oxytocin	0,02	-	0 (156)	240 (156)	140 (156)
27 Isotocin	< 0,001	0,18 (57)	0,06 (57)	320 (57)	150 (57)
28 1-Deamino[4-norvalin]oxytocin	0,01	0,03 (48)	0,001 (48)	128 (48)	56 (48)
29 [5-(N ⁴ ,N ⁴ -Dimethylasparagin)]oxytocin	0,05	-	-	9 (161)	4,6 (161)
30 [7-Gly]oxytocin	< 0,01	0,01 (160)	0,3 (160)	5,3 (160)	65 (160)
31 1-Deamino[7-gly]oxytocin	< 0,01	0,062 (160)	0,5 (160)	17 (160)	355 (160)
32 1-Deamino-oxytocinsäuredimethylamid	0,015	-	-	0 (146)	16 (146)
33 Z-Pro-leu-gly-NH ₂	0,005	-	-	-	-

⁺ Alle Angaben in Einheiten pro Milligramm.

(17) und 3,0 bei Oxytocin (23). Die höchsten Verhältnisse von Verhaltensänderung/Antidiurese waren 2,8 bei Oxytocin und 1,6 bei [5-(N⁴,N⁴-Dimethylasparagin),8-lysin]vasopressin

Es war keine Ähnlichkeit der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen für die kurzfristigen Verhaltensänderungen mit denen für die Wirkungen auf gelerntes Verhalten (46,159,164) erkennbar. Dieses Ergebnis zeigt, daß beide Wirkungen über biochemisch verschiedene Rezeptoren vermittelt werden. Dagegen ähneln die Resultate denen, die in einer anderen Arbeit über kurzfristige Verhaltenseffekte von Hinterlappenhormonen bei Mäusen berichtet wurden (30) und auch den für die Induktion von "barrel rotation" bei Ratten angegebenen Werten (86).

3. Die Analoga im Röhrentest.

Für das Verständnis der Verhaltenseffekte von Hinterlappenhormonen ist die Frage von Bedeutung, ob die verschiedenen Verhaltensänderungen, die in den verschiedenen Tests beobachtet werden, auf die gleiche Primärwirkung zurückzuführen sind oder ob sie unabhängig voneinander durch unterschiedliche Mechanismen zustande kommen. Um diese Frage wenigstens teilweise beantworten zu können, wurden die Analoga, deren Aktivität bei der Induktion von exzessivem Kratzen bestimmt wurde, im Röhrentest untersucht: Die Dissoziation der Wirksamkeit in den verschiedenen Tests war bei den untersuchten Analoga relativ gering. Tabelle 32 zeigt einige Beispiele dafür. Dieses Resultat zeigt, daß die Wirkungen in den verschiedenen Tests über biochemisch sehr ähnliche oder identische Rezeptoren vermittelt werden.

T A B E L L E 32

Wirkungen einiger Analoga im Röhrentest.

N ⁺	Peptid ⁺	Dosis	Immobilität	Fluchtverhalten
16	NaCl		219,1 ± 7,9	1,9 ± 1,0
16	1-Deamino-lysin-vasopressin	1ng	211,1 ± 8,0	2,0 ± 1,1
16		10ng	132,7 ± 11,2 ^{***}	33,1 ± 7,4 ^{***}
16		100ng	42,3 ± 7,1 ^{***}	109,2 ± 12,5 ^{***}
8	[5-(N ⁴ ,N ⁴ -Dimethylasparagin), 8-lysin]vasopressin	10ng	225,6 ± 6,2	0,3 ± 0,3
8		100ng	164,4 ± 14,1 ^{**}	24,8 ± 13,8 ^{**}
8		1µg	56,3 ± 12,8 ^{***}	79,8 ± 18,5 ^{***}
8	[1-Deamino,2-phe,7-(3,4-dehydroprolin) 8-arg]vasopressin	10ng	209,8 ± 9,9	9,3 ± 4,7 [*]
8		100ng	104,4 ± 15,5 ^{***}	52,6 ± 11,2 ^{***}
8		1µg	18,0 ± 6,6 ^{***}	86,3 ± 11,2 ^{***}
8	1-Deamino-oxytocin	250ng	164,0 ± 9,8 ^{***}	34,8 ± 10,1 ^{**}
8		2,5µg	51,5 ± 7,7 ^{***}	95,0 ± 15,6 ^{***}
8	Isotocin	50µg	223,4 ± 11,1	0,4 ± 0,4
8	7-Gly oxytocin	5µg	213,4 ± 5,3	3,3 ± 3,3

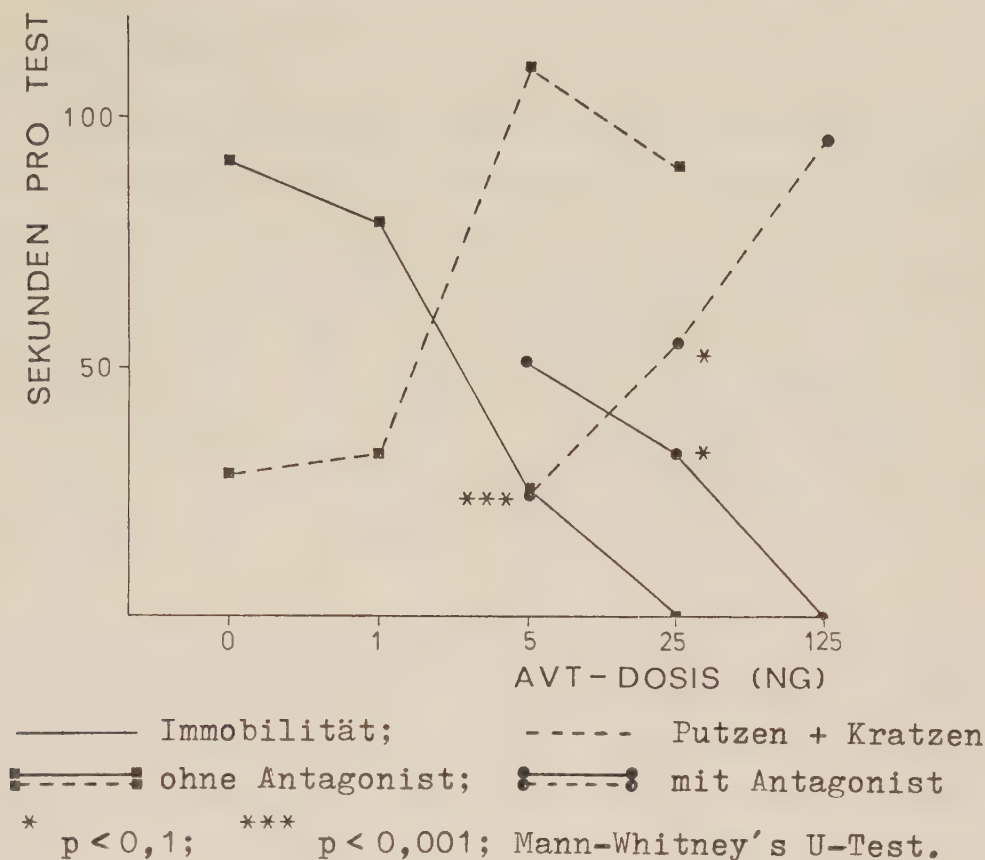
⁺ Zahl der Mäuse pro Gruppe.

⁺ Numerierung wie in Tabelle 31.

* p < 0,1; ** p < 0,01; *** p < 0,001; Mann-Whitney's U-Test.

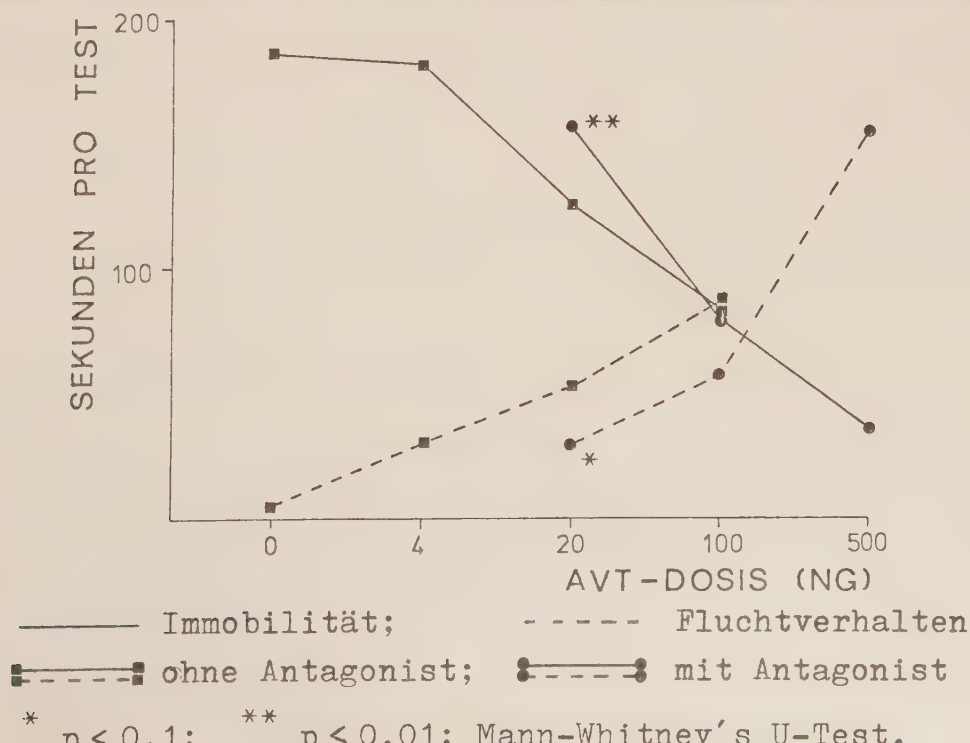
F I G. 16

Antagonisierung der Wirkungen von Arginin-vasotocin (AVT) durch $5\mu\text{g}$ N-Acetyl-[2-(O-methyl)tyrosin,8-arg]vasopressin im Kratztest.



F I G. 17

Antagonisierung der Wirkungen von Arginin-vasotocin (AVT) durch $5\mu\text{g}$ N-Acetyl-[2-(O-methyl)tyrosin,8-arg]vasopressin im Röhrentest.



4. Antagonismus.

Nur eines der getesteten Analoga war ein wirksamer Antagonist. Dabei handelt es sich um N-Acetyl-[2-(O-methyl)tyrosin,8-arg] vasopressin (Peptid 9 in Tabelle 31). Dieses Peptid ist auch ein Antagonist der blutdrucksteigernden Wirkung von Vasopressin bei Ratten mit einem pA_2 -Wert von 7,18 (72). Der pA_2 -Wert ist der negative dekadische Logarithmus der molaren Konzentration, die die biologische Wirkung von 2 Einheiten eines Agonisten so weit abschwächt, daß sie der Wirkung von 1 Einheit in Abwesenheit eines Antagonisten gleicht.

Der Antagonismus der Verhaltenseffekte von Arginin-vasotocin durch dieses Peptid war sehr schwach: Ein Antagonismus konnte nur gezeigt werden, wenn Mikrogrammengen des Antagonisten zusammen mit dem Agonisten injiziert wurden. Fig. 16 und 17 zeigen die Wirkungen einer Kombination von 5 μ g N-Acetyl-[2-(O-methyl)tyrosin,8-arginin] vasopressin mit verschiedenen Dosen AVT. Ein Antagonismus der Verhaltensänderungen konnte unter diesen Bedingungen nur bei den niedrigen und mittleren AVT-Dosen gezeigt werden. Die maximale Wirkung war nicht reduziert. Dies weist auf einen kompetitiven Antagonismus der Verhaltenseffekte von Hinterlappenhormonen durch dieses Peptid hin.

5. Die Blut-Hirn-Schranke.

Die typischen Verhaltenseffekte der Hinterlappenhormone ließen sich nach intracerebroventrikulärer, nicht jedoch nach subcutaner Injektion der Peptide nachweisen (Kap. IV,1). Die Ergebnisse weisen darauf hin, daß die Peptide nach

peripherer Applikation ihren zentralnervösen Wirkungsort nicht erreichen. Ein wichtiger Aspekt bei der Untersuchung der Analoga war die Frage, ob durch Verwendung geeigneter Analoga derartige Wirkungen auch nach systemischer Applikation auslösbar sind.

Wenn keine spezifischen Transportmechanismen vorliegen, ist das Passieren der Blut-Hirn-Schranke oder der Blut-Liquor-Schranke als Diffusion durch eine Lipiddoppelschicht zu verstehen: Nur Substanzen mit genügend lipophilen Eigenschaften dringen durch passive Diffusion ins Gehirn ein.

T A B E L L E 33

Octanol-Verteilungskoeffizienten.

	Substanz	Kv ⁺
<u>1</u>	Morphin-HCl	0,74
<u>2</u>	Mescaline-HCl	0,12
<u>3</u>	2-D-Ala-met-enkephalinamid	0,57
<u>4</u>	Lysin-vasopressin	0,0003
<u>5</u>	1-Deamino-lysin-vasopressin	0,0008
<u>6</u>	5-(N ⁴ ,N ⁴ -Dimethylasparagin), 8-lysin-vasopressin	0,01
<u>7</u>	Oxytocin	0,05
<u>8</u>	1-Deamino-oxytocin	0,12

⁺ Bei pH 7,3 bestimmt.

Substanz 1 bis 3 durch Messung von E₂₈₀,

Substanz 4 bis 8 im Biotest bestimmt.

Als Modell für die Verhältnisse an der Blut-Hirn-Schranke kann die Verteilung von Substanzen zwischen einer wäßrigen und einer hoch apolaren organischen Phase verwendet werden (106,138). Der Verteilungskoeffizient K_v gibt Aufschluß über die lipophilen Eigenschaften einer Substanz.

$$K_v = \frac{\text{Konzentration in der Oberphase}}{\text{Konzentration in der Unterphase}}$$

In einem derartigen Versuch wurden die Verteilungskoeffizienten von Peptiden und Analoga zwischen Wasser und n-Octanol bestimmt und mit denen zentralnervös wirksamer Pharmaka verglichen.

Tabelle 33 zeigt die Verteilungskoeffizienten der untersuchten Substanzen. Die als Vergleichssubstanzen verwendeten Drogen Morphinum und Mescaline passieren die Blut-Hirn-Schranke langsam durch passive Diffusion (105,107). 2-D-Ala-met-enkephalinamid wirkt nach systemischer Applikation nicht analgetisch, wahrscheinlich wegen ungenügender Penetration der Blut-Hirn-Schranke (111). Mehrere andere Enkephalinanaloga mit ähnlichen lipophilen Eigenschaften dagegen lösen nach systemischer Applikation auch zentralnervöse Wirkungen aus (37,126,172).

Die Verteilungskoeffizienten von Oxytocin, Vasopressin und den meisten Analoga liegen deutlich niedriger als die von Morphinum, Mescaline und 2-D-Ala-met-enkephalinamid. Dies stützt die Annahme, daß diese Peptide die Blut-Hirn-Schranke nicht durch einfache Diffusion passieren können.

Da die meisten der getesteten "unpolaren" Analoga (Nr. 24, 25, 26, 28, 31 und 32 in Tabelle 31) biologisch wenig aktiv sind, ist es voraussichtlich nicht einfach, ein Analogon zu finden, das durch passive Diffusion die Blut-Hirn-Schranke passiert und in akzeptabler Dosierung die typischen Verhaltensänderungen auslöst.

VI. Artspezifität von Peptidwirkungen.

Über die Artspezifität der akuten Verhaltenseffekte von Hinterlappenhormonen existieren keine systematischen Untersuchungen. Bei Ratten wurden nach intracerebroventrikulärer Injektion von Vasopressin und verwandten Peptiden "barrel rotation", d. h. Rotation um die sagittale Körperachse, Ataxie, Trinken, Putzen, Nestbauverhalten und Lungenödem beschrieben (86).

Um die Wirkungen von Hinterlappenhormonen bei Ratten mit denen bei Mäusen vergleichen zu können, wurden die

T A B E L L E 34

Wirkungen von Oxytocin und Arginin-vasopressin (AVP) im "Rattenkratztest".

N ⁺	Behandlung ⁺	Immobilität	Putzen	Kratzen	Laufen	Aufrichten
9	NaCl	161,0 ± 17,8	12,1 ± 3,3	0,2 ± 0,1	22,8 ± 4,4	3,3 ± 0,7
6	Oxytocin 1µg	134,6 ± 26,3	50,8 ± 11,8 ^{**}	0,0 ± 0,0	19,9 ± 4,4	2,2 ± 0,9
6	Oxytocin 10µg	105,6 ± 20,7	59,6 ± 12,4 ^{**}	0,7 ± 0,4 [*]	23,8 ± 6,4	3,6 ± 1,6
6	AVP 50ng	158,3 ± 22,1	67,7 ± 16,0 ^{**}	0,0 ± 0,0	10,6 ± 3,0 [*]	1,0 ± 0,5 [*]
6	AVP 500ng	186,6 ± 22,1	18,6 ± 6,8	1,2 ± 0,8	16,2 ± 3,6	1,8 ± 0,5 [*]

⁺ Zahl der Mäuse pro Gruppe.

⁺ Intracerebroventrikuläre Injektionen, Injektionsvolumen = 50µl/Ratte.

^{*} p < 0,1; ^{**} p < 0,01; Mann-Whitney's U-Test.

Wirkungen bei Ratten in den bei Mäusen verwendeten Verhaltenstests bestimmt: Die Peptide wurden in 50µl Kochsalzlösung gelöst und unter leichter Äthernarkose injiziert. Der "Kratztest" wurde in einem 32,5 x 54,5cm großen Plastikkäfig durchgeführt, für den Röhrentest wurde eine 6,4 x 40cm große Plexiglasröhre verwendet. Im übrigen wurden die Tests so durchgeführt wie bei den Mäusen.

Tabelle 34 zeigt die Wirkungen von Oxytocin und Arginin-vasopressin im "Kratztest" bei Ratten: In diesem Test wurde nur das Putzverhalten signifikant stimuliert, das bei Mäusen typische exzessive Kratzen trat dagegen nicht auf.

T A B E L L E 35

Wirkungen von Oxytocin und Arginin-vasopressin (AVP) im Rattenröhrentest.

N ⁺	Behandlung ⁺	Immobilität	Putzen	Kratzen	Fluchtverhalten
25	NaCl	220,1 ± 4,1	3,9 ± 1,5	0	1,2 ± 0,6
15	Oxytocin 1µg	196,7 ± 5,7 ^{***}	0,0 ± 0,0 ^{**}	0	10,5 ± 4,9 [*]
18	Oxytocin 10µg	173,3 ± 10,0 ^{***}	6,2 ± 3,4	0	14,7 ± 5,4 [*]
18	AVP 50ng	213,1 ± 5,0 [*]	10,5 ± 4,3	0	1,9 ± 1,7
19	AVP 500ng	205,5 ± 5,7 [*]	22,3 ± 7,9 [*]	0	8,6 ± 3,0 ^{**}

⁺ Zahl der Ratten pro Gruppe.

⁺ Intracerebroventrikuläre Injektionen, Injektionsvolumen = 50µl/Ratte.

* p < 0,1; ** p < 0,01; *** p < 0,001; Mann-Whitney's U-Test.

Auch die Immobilitätsphasen wurden nicht wesentlich reduziert. Barrel rotation wurde bei den verwendeten Dosen nur bei etwa 5% der Ratten und generell nur für kurze Zeit unmittelbar nach dem Aufwachen aus der Äthernarkose beobachtet. Andere Bewegungsanomalien und toxische Reaktionen waren bei den verwendeten Dosierungen nicht nachweisbar.

Im Röhrentest traten ebenfalls Wirkungen auf, die mit den bei Mäusen beobachteten Verhaltensänderungen vergleichbar sind, allerdings wiederum in sehr stark abgeschwächter Form. In beiden Tests waren die Wirkungen bei Oxytocin deutlicher ausgeprägt als bei Vasopressin.

Die Ergebnisse zeigen, daß akute Verhaltenseffekte Vasopressinähnlicher Peptide auch bei nahe miteinander verwandten

T A B E L L E 36

Wirkungen von Bombesin im Rattenkratztest.

N ⁺	Behandlung [†]	Immobilität	Putzen	Kratzen	Laufen	Aufrichten
3	NaCl	170,2 ± 22,1	31,1 ± 8,7	0,1 ± 0,1	12,0 ± 2,8	4,2 ± 1,2
9	Bombesin 50ng	133,8 ± 23,2	51,8 ± 13,3 [*]	7,2 ± 7,1	11,7 ± 3,9	2,6 ± 1,0
9	Bombesin 250ng	59,4 ± 22,8 ^{**}	21,4 ± 3,8	135,3 ± 22,1 ^{***}	16,0 ± 3,3	2,6 ± 0,9
9	Bombesin 1,25µg	105,6 ± 26,4 [*]	29,3 ± 9,0	90,0 ± 13,6 ^{***}	9,3 ± 2,7	1,0 ± 0,5 [*]
9	Bombesin 6,25µg	91,6 ± 23,7 [*]	35,1 ± 9,5	80,8 ± 19,1 ^{***}	10,0 ± 3,2	2,6 ± 1,4

Zahl der Ratten pro Gruppe.

Intracerebroventrikuläre Injektionen, Injektionsvolumen = 50µl/Ratte.

p < 0,1; ** p < 0,01; *** p < 0,001; Mann-Whitney's U-Test.

T A B E L L E 37

Wirkungen von Bombesin im Rattenröhrentest.

N ⁺	Behandlung ⁺	Immobilität	Putzen	Kratzen	Fluchtverhalten
10	NaCl	229,1 ± 4,7	2,6 ± 1,8	0,0 ± 0,0	3,0 ± 2,9
9	Bombesin 250ng	189,4 ± 13,0**	21,7 ± 9,7*	2,0 ± 1,3	13,6 ± 8,3
10	Bombesin 1,25µg	196,9 ± 9,1**	9,4 ± 3,7*	8,0 ± 3,2*	5,5 ± 2,7

⁺ Zahl der Ratten pro Gruppe.

⁺ Intracerebroventrikuläre Injektionen, Injektionsvolumen = 50µl/Ratte.

* p < 0,1; ** p < 0,01; Mann-Whitney's U-Test.

Tierarten sehr verschieden aussehen können. Die Wirkungen traten jedoch bei Ratten im gleichen Dosisbereich auf wie bei Mäusen. Die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen für die Auslösung von "barrel rotation" bei Ratten (86) zeigen große Ähnlichkeit mit jenen für die verhaltensändernde Wirkung bei Mäusen (30). Dies spricht dafür, daß die qualitativ zum Teil verschiedenen Wirkungen dieser Peptide bei verschiedenen Tierarten über ähnliche Rezeptoren vermittelt werden. Bei Hamstern wurden nach intracerebroventrikulärer Injektion von 2µg Vasopressin ausgeprägte Verhaltensänderungen beobachtet (29). Über kurzfristige Verhaltenseffekte von Vasopressin und verwandten Peptiden bei anderen Tierarten liegen keine Informationen vor.

Weniger ausgeprägt ist die Artspezifität der Verhaltenseffekte bei Bombesin: Dieses Peptid löste bei Mäusen exzessives Putzen und Kratzen, Immobilitätsreduktion und eine Verminderung des Aufrichtens auf die Hinterbeine aus

(Siehe Tab. 12). Bei Ratten wurde ebenfalls Kratzen mit den Hinterbeinen stimuliert, nicht jedoch das Putzverhalten (Tab. 36). Die Verminderung der Immobilität und des Aufrichtens auf die Hinterbeine war schwächer ausgeprägt als bei den Mäusen. Auch im Röhrentest (Tab. 37) waren die Wirkungen wesentlich schwächer als bei den Mäusen (Tab. 13). Wie im Fall der Hinterlappenhormone traten auch hier die Wirkungen bei den Ratten in einem Dosisbereich auf, der den bei Mäusen wirksamen Dosen entspricht. Dies spricht wiederum dafür, daß die Wirkungen bei den verschiedenen Tierarten über nahe verwandte Rezeptoren vermittelt werden.

Material und Methoden

1. Peptide.

Substanz P, Angiotensin II, Bombesin, ACTH, 65 I.U./mg, α -MSH, Gastrin, LHRH, Somatostatin, Prolyl-leucyl-glycinamid (= MIF-1), Lysin-vasopressin (LVP), 231 I.U./mg, Arginin-vasopressin (AVP), 367 I.U./mg und Arginin-vasotocin (AVT) wurden von Sigma Chemicals bezogen.

Delta sleep inducing peptide (DSIP), Leucin-enkephalin, 2-D-Ala-met-enkephalinamid (DALA), Thyreotropin-Freisetzungsfaktor (TRH), Threonyl-valyl-leucin, Bradykinin-Triacetat, Apamin, Neurotensin und Isotocin wurden von Serva, Heidelberg bezogen.

α -Endorphin und Cholecystokinin-Octapeptid wurden von Calbiochem bezogen.

Die in Kapitel V verwendeten synthetischen Peptidanaloga wurden von Dr. William H. Simmons vom Medical Center der University of Illinois in Chicago freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Desglycinamid-lysin-vasopressin wurde durch Inkubation von 15 μ g/ml LVP mit 100 μ g/ml Trypsin bei pH 7,5 für 3 Stunden bei 37°C hergestellt.

2. Pharmaka.

Muscimol, D-Amphetamin-Sulfat, Hexamethonium-HBr, DL-Propranolol-HCl, Pargylin-HCl und Tranylcypromin = trans-2-Phenylcyclopropylamin wurden von Sigma Chemicals bezogen.

Atropin-Sulfat wurde von Serva, Heidelberg bezogen,
Ergotamin-D-Tartrat von Roth,
Regitin = Phentolamin von Ciba-Geigy,
Naloxon-HCl von Endo Laboratories,
Megaphen = Chlorpromazin-HCl von Bayer,
Amitriptylin-HCl von Industria Chimica Milanese,
Morphin-HCl und Coffein von Merck.

Imipramin wurde aus Iminodibenzyl synthetisiert, über das Sulfat gereinigt, mit HCl umgesetzt und aus Alkohol-Äther umkristallisiert.

Mescaline = 3,4,5-Trimethoxyphenäthylamin wurde aus 3,4,5-Trimethoxybenzaldehyd über das 3,4,5-Trimethoxynitrostyrol synthetisiert, mit HCl umgesetzt und aus Alkohol-Äther umkristallisiert.

MDA = DL-3,4-Methylendioxyamphetamin wurde aus Piperonal über das 3,4-Methylendioxy- α -methyl-nitrostyrol synthetisiert, mit HCl umgesetzt und aus Alkohol-Äther umkristallisiert.

Alle Dosisangaben beziehen sich auf die hier angegebenen Salze der Pharmaka.

3. Tiere.

Männliche Albinomäuse vom Stamm CF1/W68, 25-35g, wurden von Fa. Winkelmann & Co in Paderborn bezogen.

Männliche Sprague-Dawley Albinoratten, 180-220g, wurden von Mus Rattus in München bezogen.

4. Extrakte.

a) Ausgangsmaterial.

Gehirn- und Hypophysengewebe von Schweinen, das den Tieren etwa 20 Minuten nach dem Tod entnommen wurde, wurde zum Teil

vom Schlachthof Göttingen-Roßdorf und zum Teil von der Firma Schmidtpeter in München bezogen. Das Material wurde bis zur Aufarbeitung bei -70°C gelagert.

b) Extraktionen.

Das gefrorene Gewebe wurde zerkleinert und mit 2 Volumen Aceton (bezogen auf Frischgewicht) bei $2-6^{\circ}\text{C}$ in einem Sorvall Omni-Mixer homogenisiert. Das Homogenat wurde 30 Minuten mit 8000g zentrifugiert und der Niederschlag mit einem Volumen 70% Aceton reextrahiert. Von den vereinigten Überständen wurde das Aceton am Rotationsverdampfer und anschließend das Wasser am Gefriertrockner entfernt. Der Rückstand wurde dreimal mit je 0,2 Volumen (bezogen auf das Frischgewicht des Ausgangsmaterials) Hexan gewaschen und mit $3 \times 0,1$ Volumen Methanol extrahiert. Der Methanolextrakt wurde am Rotationsverdampfer eingedampft und der Rückstand für die weitere Reinigung verwendet.

c) Reinigung auf Sephadex G-25 fine (Fig. 6).

Die $2 \times 40\text{cm}$ -Säule wurde mit 15mM NaCl äquilibriert, das extrahierte Material wurde in einem Volumen von 4ml aufgetragen und bei $3 - 6^{\circ}\text{C}$ mit $6 - 8\text{ml}/\text{cm}^2 \times \text{h}$ eluiert. Die 5ml-Fraktionen wurden lyophilisiert und der Rückstand in 0,5ml Wasser aufgenommen.

d) Erste Präparation.

Das extrahierte Material wurde bei $3 - 6^{\circ}\text{C}$ einer Craigschen Gegenstromverteilung zwischen n-Butanol und 500mM Ammoniumacetatpuffer, pH 6,8 mit einem 8-Scheidetrichter-Transfer unterworfen. Die vereinigten Oberphasen wurden lyophilisiert, der Rückstand bei 0°C in 10ml absolutem Äthanol aufgenommen und auf einer $2,5 \times 10\text{cm}$ -Säule mit basischem Aluminiumoxyd (Woelm) mit stufenweise ansteigenden Konzentrationen von Wasser eluiert (Fig. 8):

100ml absoluter Alkohol		
100ml	95%	"
100ml	90%	"
100ml	80%	"
100ml	60%	"
100ml	H ₂ O	

Dieser Lauf wurde bei -5 bis 0°C durchgeführt, die Elutionsgeschwindigkeit betrug 30ml/cm²xh, die Fraktionsgröße 5ml.

e) Zweite Präparation.

Nach der Gegenstromverteilung wurde das Material aus den Butanolphasen in 75ml 0,005M Ammoniumacetatpuffer, pH 5,8 aufgenommen und auf eine mit dem gleichen Puffer äquilibrierte 2,5 x 27cm-Säule Servacel CM-52 aufgetragen (Fig. 10). Eluiert wurde bei 0 - 5°C mit 310ml 5mM Ammoniumacetatpuffer pH 5,8, 330ml 20mM Ammoniumacetatpuffer, pH 5,8 und einem Gradienten von 1500ml 20mM NH₄Ac, pH 5,8 auf 1260ml 200mM NH₄Ac, pH 7,0. Die Fließgeschwindigkeit betrug 12ml/cm²xh, die Fraktionsgröße 10ml.

f) Endreinigung.

Reinigung an Biogel P-2 (Fig. 11): Es wurde eine 1,0 x 108cm-Säule Biogel P-2, -400mesh verwendet. Die Säule war mit 50mM NH₄Ac-Puffer, pH 6,4 äquilibriert. Die Probe wurde in einem Volumen von 0,2 - 0,4ml Puffer aufgetragen, die Fließgeschwindigkeit betrug 3-4ml/cm²xh, die Fraktionsgröße 1ml.

Hochdruck-Füssigkeitschromatographie (Fig. 12): Für die reversed-phase-Chromatographie wurde ein HPLC-Gerät von Hewlett-Packard mit einer Hibar RP-18 Säule, 4,5 x 300mm, von Merck verwendet. Das Material wurde in einem Volumen von 200µl aufgetragen, eluiert wurde mit 60ml eines linearen Gradienten von 10 auf 45% Acetonitril in 0,005M Natriumphosphatpuffer, pH 3,0. Die Fließgeschwindigkeit betrug 2ml/Minute, die Fraktionsgröße 1ml.

g) Aminosäureanalyse und Aminosäuresequenz.

Aminosäureanalysen und Sequenzanalysen wurden von Dr. F. Lottspeich am Max Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

Für die Aminosäureanalyse wurde die Probe, die ca. 5nMol des Peptids enthielt, in 200µl 6,4N HCl 24 Stunden lang bei 110°C im Vakuum hydrolysiert. Für die halbquantitative Aminosäureanalyse wurde ein Beckmann-Analysator verwendet. Die Sequenzanalyse wurde mit einem Sequenator durch stufenweisen Abbau vom Aminoterminal nach dem Edmann - Verfahren durchgeführt. Die PTH-Aminosäuren wurden durch reversed-phase-HPLC identifiziert.

Die Pyroglutamasebehandlung von Peptiden mit blockiertem N-Terminus wurde folgendermaßen durchgeführt: 30nMol des Peptids wurden mit 30µl einer 2%igen Lösung von Pyroglutamyl-Aminopeptidase (Boehringer) und 70µl 100mM Natriumphosphatpuffer, pH 8,0, der 4,16mg/ml EDTA und 0,77mg/ml Dithiothreitol enthielt, 16 Stunden bei 37°C inkubiert und ohne weitere Behandlung sequenziert.

5. Verteilungskoeffizienten.

Organische Phase: n-Octanol.

Wäßrige Phase: 145mM NaCl + 5mM Tris-HCl, pH 7,3.

Die Substanzen wurden in 1ml der wäßrigen (= unteren) Phase gelöst. Die Lösung wurde mit 1ml n-Octanol überschichtet. Die Ansätze wurden 15 Minuten bei 35-40°C auf dem Whirlmix geschüttelt und anschließend 15 Minuten bei 2000g zentrifugiert. Aus Ober- und Unterphase wurden je 600µl entnommen. Das Material aus der Unterphase wurde lyophilisiert und in 600µl Wasser aufgenommen. Die Oberphase wurde zweimal mit je 1ml Wasser und zweimal mit je 1ml 0,01N HCl extrahiert, die vereinigten Extrakte lyophilisiert und in 200µl oder 600µl Kochsalzlösung aufgenommen.

Die Konzentrationen wurden bei den Hinterlappenhormonen und ihren Analoga im Biotest und bei den anderen Substanzen durch Messung der Extinktion bei 280nm bestimmt.

Diskussion.

1. Die Methoden.

Ziel dieser Arbeit war es, Peptide mit psychotropen Eigenschaften zu finden, insbesondere stimulierenden, antidepressiven oder ähnlichen Wirkungen. Dazu sind Screeningverfahren notwendig mit Methoden, die nicht nur gut reproduzierbare Ergebnisse liefern, sondern auch leicht durchführbar sind. Zur Applikation der Peptide wurde daher die direkte intracerebroventrikuläre Injektion gewählt mit einem relativ großen Injektionsvolumen, das eine möglichst gleichmäßige Verteilung des injizierten Materials in den Liquorräumen garantiert. Auf das zeitraubende Arbeiten mit implantierten Kanülen wurde verzichtet. Im Falle der Hinterlappenhormone lassen sich die so erhaltenen Ergebnisse mit den mit anderer Methodik erzielten Resultaten anderer Gruppen vergleichen: Gegenüber den Ergebnissen, die mit implantierten Kanülen und einem Injektionsvolumen von $2 \times 1 \mu\text{l}$ erzielt wurden (29,30), waren in der vorliegenden Arbeit die Verhaltenseffekte bei etwa 20-100fach niedrigerer Dosierung nachweisbar. Bei Verwendung einfacher Verhaltenstests liefert die direkte intracerebroventrikuläre Injektion gut reproduzierbare Ergebnisse bei vertretbarem Arbeitsaufwand und ist für viele Zwecke anderen Techniken überlegen. Störende Einflüsse durch die Injektionsprozedur können durch Verwendung geeigneter Kontrollen berücksichtigt werden.

2. Verhaltenseffekte bei Peptiden.

Bei einem erheblichen Prozentsatz der getesteten biologisch aktiven Peptide waren Wirkungen in den verwendeten Verhaltenstests nachweisbar (Kap. II). Tatsächlich ist der Anteil der Peptide, die über zentralnervöse Mechanismen das Verhalten beeinflussen können, noch größer: Einige Peptide werden im Zentralnervensystem so schnell abgebaut, daß erst nach extrem hohen Dosen biologische Wirkungen nachweisbar sind. Ein typisches Beispiel hierfür sind die Enkephaline, die durch eine Aminopeptidase sehr schnell inaktiviert werden (94,111). Das proteolysestabile 2-D-Ala-met-enkephalinamid dagegen ist biologisch hoch aktiv, obwohl die Affinität für die Endorphinrezeptoren nicht erhöht ist (111). Andere Peptide, wie das MSH und ACTH, beeinflussen gelernte Verhaltensweisen, die in einfachen Verhaltenstests der hier verwendeten Art nicht nachweisbar sind (8,47). Einige Peptide sind in bestimmten pharmakologischen Tests wirksam, ohne in einfachen Verhaltenstests auffallende Wirkungen zu verursachen: MIF-1 und TRH potenzieren die Verhaltenseffekte von exogenem L-DOPA bei Mäusen, sind aber in einfachen Verhaltenstests wenig wirksam (68,69,115,118). Die in den hier verwendeten einfachen Verhaltenstests gefundenen Wirkungen unterstreichen die Bedeutung von Neuropeptiden für das tierische und wahrscheinlich auch das menschliche Verhalten.

Da die Wirkungen von Peptiden in derartigen Tests oft artspezifische Verhaltensweisen betreffen und ein Vergleich mit Wirkungen beim Menschen im allgemeinen nicht möglich ist, ist eine Interpretation solcher Wirkungen äußerst schwierig. Ein Beispiel für das Problem der Artspezifität von Verhaltenseffekten gibt das durch intracerebroventrikulär injiziertes Mescaline bei Mäusen ausgelöste exzessive Kratzen: Eine Beziehung zwischen diesem Verhaltenseffekt und den bei dieser Droge gut untersuchten psychotropen Wirkungen beim Menschen läßt sich nicht ohne weiteres erkennen.

3. Die Wirkungen der Hinterlappenhormone.

Die interessantesten Verhaltenseffekte wurden bei den Hinterlappenhormonen Oxytocin und Vasopressin festgestellt. Bemerkenswert ist hierbei die starke Situationsabhängigkeit der Wirkungen: Bei Mäusen wurden im Käfig Putzen und Kratzen stark stimuliert, in "bedrohlichen" Situationen dagegen Fluchtverhalten. Bombesin dagegen stimulierte Putzen und Kratzen sowohl im Käfig als auch im Röhrentest, in dem Vasopressin-injizierte Mäuse mit Fluchtverhalten reagieren. Die Bombesinwirkung kann daher als direkte Einwirkung auf an diesen spezifischen Verhaltensmustern beteiligte sensorische oder motorische Strukturen verstanden werden. Die Vasopressinwirkungen sind mit einer derartigen Interpretation nur bedingt vereinbar: Entweder liegen weitere direkte Wirkungen auf motorische Strukturen vor oder es werden direkt oder indirekt neuronale Strukturen beeinflusst, die in weniger spezifischer Weise modulierend auf sensorische oder motorische Prozesse einwirken. In diesem Falle wäre eine Abschwächung oder Verstärkung von Verhaltens-tendenzen zu erwarten. Eine mögliche Charakterisierung der durch Vasopressin und ähnliche Peptide ausgelösten Verhaltensänderungen wäre die Annahme, daß in Streßsituationen "aktive" gegenüber "passiven" Reaktionen begünstigt werden. Dabei wird das Kratzen und Putzen, das nach der intracerebroventrikulären Injektion auftritt, als "aktive" Reaktion auf den durch die Injektion ausgelösten Schmerzreiz aufgefaßt.

Der Vergleich mit den Wirkungen psychotroper Drogen ist wenig aufschlußreich: Die Immobilitätsreduktion im Schwimmtest gilt zwar als typisch für die klinisch verwendeten Psychostimulantien und Antidepressiva (116,117), das durch die Peptide ausgelöste Putzen und Kratzen dagegen tritt bei diesen Psychopharmaka nicht auf.

4. Struktur-Aktivitäts-Beziehungen: Der Rezeptor.

Die Hormone des Hypophysenhinterlappens üben eine Vielzahl biologischer Wirkungen aus: Antidiurese und Vasokonstriktion sowie die Kontraktion von Uterus und Milchdrüse sind die bekanntesten hormonalen Effekte. Darüber hinaus sind zentralnervöse Wirkungen bekannt: Wirkungen auf das Vergessen bedingter Vermeidereaktionen (9,163), den hippocampalen Thetarhythmus (9), Puromycin-induzierte Amnesie (159), die Selbstapplikation von Heroin (122), die Toleranzbildung gegen Morphin (125) und Äthanol (63,64) und intrakraniale Selbststimulation (35,133,134,135). Die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen für diese zentralnervösen Wirkungen zeigen, soweit sie untersucht wurden, keine Ähnlichkeit mit denen für die hormonalen Wirkungen (159, 164). Bei den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen über Struktur-Aktivitäts-Beziehungen konnte dagegen eindeutig eine weitgehende Parallelität der verhaltensändernden Potenz mit den Wirkungen auf periphere Organe, vor allem mit der blutdrucksteigernden Wirkung bei Säugetieren, nachgewiesen werden. Nur bei einigen Analoga war eine stärkere Dissoziation von verhaltensändernder und blutdrucksteigernder Wirkung nachweisbar.

Da die Vasopressinrezeptoren in den Blutgefäßen, die die blutdrucksteigernde Wirkung vermitteln, heterogen sind (2), erscheint es möglich, daß die kurzfristigen Verhaltenseffekte Vasopressin-ähnlicher Peptide nicht auf eine direkte Wirkung an neuronalen Strukturen, sondern auf eine konstriktorische Wirkung an cerebralen Blutgefäßen zurückzuführen sind. Bisher ließ sich eine Wirkung von zentralnervös appliziertem Vasopressin auf die Blutversorgung des Gehirns allerdings nicht nachweisen: Bei betäubten Rhesusaffen wurde durch Vasopressin, das in der relativ hohen Dosierung von 5µg intracerebroventrikulär injiziert wurde, der cerebrale Blutfluß nicht ver-

ändert (120). Die cerebrale Wasserpermeabilität dagegen wurde erhöht, obwohl der cyclo-AMP-Gehalt in cerebralen Mikrogefäßen von Vasopressin nicht beeinflusst wird (62.) Diese Befunde sprechen, ebenso wie die Art der beobachteten Verhaltensänderungen und die geringe Toxizität, gegen die Annahme, daß die Verhaltensänderungen durch generelle cerebrale Vasokonstriktion ausgelöst werden. Die Frage, ob zentralnervös appliziertes Vasopressin Änderungen des lokalen Blutflusses im Gehirn auslösen kann, wird zur Zeit untersucht (W.H. Simmons, persönliche Mitteilung).

Auch pharmakologische Befunde stützen nicht die Annahme, daß die durch Oxytocin und Vasopressin ausgelösten Verhaltensänderungen über eine vasokonstriktorische Primärwirkung vermittelt werden: Vasokonstriktorische Substanzen wie Amphetamin, Angiotensin, Adrenalin (59), Ergotamin (29) und Prostaglandin $F_{2\alpha}$ (29) lösen keine Verhaltensänderungen aus, die mit denen Vasopressin-ähnlicher Peptide vergleichbar sind. Die Frage, ob die Rezeptoren, die die durch Oxytocin und Vasopressin ausgelösten kurzfristigen Verhaltensänderungen vermitteln, an Neuronen oder Blutgefäßen lokalisiert sind, kann daher noch nicht beantwortet werden.

5. Physiologische Bedeutung der Verhaltenseffekte von Hinterlappenhormonen.

Die vorliegenden Ergebnisse geben über die physiologische Bedeutung der Verhaltenseffekte von Oxytocin und Vasopressin keinen Aufschluß. Die rasche Toleranzbildung liefert, ähnlich wie im Fall der Endorphine, den Hinweis, daß der die biologischen Wirkungen vermittelnde Rezeptor unter physiologischen Bedingungen nur in bestimmten Situationen,

nicht jedoch tonisch aktiviert wird und daß die Dosierungen, die normalerweise zur Auslösung der Verhaltensänderungen injiziert werden, entweder unphysiologisch hoch sind oder aber daß vergleichbar hohe Konzentrationen unter physiologischen Bedingungen nur vorübergehend für kurze Zeit erreicht werden. In diesem Fall wäre zu erwarten, daß nach zentralnervöser Applikation von Antikörpern oder spezifischen Antagonisten nur in bestimmten experimentellen Situationen Verhaltensänderungen zu beobachten sind.

Ein wertvolles Instrument zur Untersuchung der physiologischen Bedeutung der kurzfristigen Verhaltenseffekte von Vasopressin und Oxytocin können Antagonisten wie zum Beispiel das N-Acetyl-[2-(O-methyl)tyrosin,8-arginin]vasopressin sein: Von einem derartigen intrinsischen (= receptorspezifisch wirkenden) Antagonisten ist zu erwarten, daß er nicht nur die Wirkungen von intracerebroventrikulär injiziertem Oxytocin und Vasopressin aufhebt, sondern auch die Wirkungen der endogenen Peptide. Ein Beispiel für die vielseitige Verwendbarkeit intrinsischer Antagonisten liefern die Opiatantagonisten, die zur Untersuchung zahlreicher neuropharmakologischer, neurophysiologischer und selbst psychiatrischer Fragen eingesetzt werden (28,70,71,91).

Oxytocin und Vasopressin kommen im Liquor vor, aber normalerweise sind die Konzentrationen sehr niedrig (31,32). Perikarya und Axone, die Oxytocin, Vasopressin oder Neuropeptin enthalten, kommen dagegen nicht nur im Hypothalamus vor, sondern auch in vielen anderen Teilen des Gehirns (17,33,61,137,142,143,162). Vasopressinhaltige Nervenendigungen wurden im lateralen Septum, dem lateralen Teil des Nucleus habenularis und im medialen Kern der Amygdala beschrieben, Oxytocin enthaltende Nervenendigungen im medialen Kern der Amygdala. Diese Nervenendigungen bilden Synapsen an Dendriten, teilweise auch an Perikarya (33). Oxytocin- oder vasopressinhaltige Nervenendigungen an cerebralen Blutgefäßen wurden nicht beobachtet.

Bei den Wirkungen der Hinterlappenhormone auf gelerntes Verhalten scheint es sich eher um eine langfristige "neuromodulatorische" Wirkung zu handeln als um eine für einen klassischen Transmitter typische Wirkung. Die kurzfristigen Verhaltenseffekte dagegen, die offenbar nur so lange zu beobachten sind, wie sich das intakte Peptid in genügender Konzentration an den Rezeptoren befindet, sind mit der Annahme einer neurotransmitterähnlichen Wirkungsweise vereinbar. Es kann sich also bei den Rezeptoren, die die akuten Verhaltenseffekte der Hinterlappenhormone vermitteln, um postsynaptische Rezeptoren handeln. Die "neuromodulatorische" Wirkung auf gelerntes Verhalten, die bereits durch niedrigere Dosen der Peptide ausgelöst werden kann (9,85, 133,134,164), könnte unter physiologischen Bedingungen durch einen "overflow" von Oxytocin, Vasopressin oder deren Abbauprodukten an neuronalen Strukturen ausgelöst werden, die nicht in unmittelbarer Nachbarschaft der peptidergen Synapsen liegen.

6. Die Blut-Hirn-Schranke.

Die Frage, ob niedermolekulare Peptide die Blut-Hirn-Schranke passieren können, ist kontrovers. Es gibt Befunde, nach denen einige physiologisch aktive Peptide, darunter Vasopressin, Oxytocin (87) und die Enkephaline (55,76), vom Gehirn aufgenommen werden.

Die Wirkungen von Oxytocin und Vasopressin auf gelerntes Verhalten treten auch nach systemischer Verabreichung der Peptide auf (9,46,164). Die kurzfristigen Verhaltensänderungen konnten dagegen nur nach intracerebroventrikulären Injektionen nachgewiesen werden, und mit einer passiven

Diffusion durch die Blut-Hirn-Schranke oder die Blut-Liquor-Schranke ist auf Grund der geringen Lipidlöslichkeit der Peptide nicht zu rechnen. Auch konnte gezeigt werden, daß die Konzentrationen von Oxytocin und Vasopressin im Liquor weitgehend unabhängig von den Konzentrationen im Blutplasma sind (31). Die Wirkungen der Hinterlappenhormone und ihrer aktiven Fragmente auf gelerntes Verhalten, die auch unter physiologischen Bedingungen relevant sind (167,169), treten nach intracerebroventrikulärer Injektion bei Ratten oft bereits in einem Dosisbereich von 25-500 Picogramm auf (159,164,170), also bei niedrigerer Dosierung als die kurzfristigen Verhaltensänderungen bei Mäusen. Es besteht daher die Möglichkeit, daß sehr geringe Mengen von Oxytocin, Vasopressin oder ihren Fragmenten nach systemischer Applikation das Gehirn erreichen. Denkbar ist das Vorhandensein spezifischer Transportmechanismen, die entweder eine sehr geringe Kapazität haben oder nur in begrenzten Hirnarealen vorkommen. Derartige Transportmechanismen wurden bisher allerdings nicht nachgewiesen.

Auch bei anderen Peptiden, wie zum Beispiel den Endorphinen und dem ACTH, wurden sowohl verhaltensändernde Wirkungen beschrieben, die nur nach intracerebroventrikulärer Injektion auftreten als auch solche, die auch nach systemischer Applikation nachweisbar sind (76). In einigen Fällen, so bei den Enkephalinen (37,126,172) und dem β -Casomorphin (V. Brantl und F. Lottspeich, persönliche Mitteilung), ist es gelungen, durch die Synthese von proteolysestabilen bzw. hydrophoben Analoga Peptide zu erhalten, die nach systemischer Verabreichung zentralnervöse Wirkungen zeigen, die bei der Ausgangssubstanz nur nach zentralnervöser Applikation nachweisbar sind. Bei den Hinterlappenhormonen, bei denen neben der geringen biologischen Halbwertszeit im Blut (88) eine zu geringe Lipidlöslichkeit der wichtigste Faktor zu sein scheint, ist dieses Ziel

voraussichtlich schwer zu erreichen: Die relativ unpolaren Analoga, wie zum Beispiel das Deamino-oxytocin, lösen erst in sehr hoher Dosierung akute Verhaltensänderungen aus. Auch sind selbst diese Analoga noch so wenig lipidlöslich, daß bestenfalls eine sehr langsame Diffusion durch die Blut-Hirn-Schranke und die Blut-Liquor-Schranke zu erwarten ist.

7. Extrakte.

Die Untersuchung von Hypophysenextrakten ergab, daß die Wirkungen, die diese Extrakte in den verwendeten Verhaltenstests zeigten, ganz oder überwiegend auf die bekannten Hinterlappenhormone zurückzuführen waren. Es konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß ein kleiner Teil der biologischen Aktivität auf unbekannte Peptide zurückgeht. Interessant ist die Auffindung von LHRH in einem der Extrakte. Dieses Peptid wurde erstmals 1971 aus 165.000 Schweinehypothalami über 12 Reinigungsschritte isoliert und strukturell aufgeklärt. Dabei wurde jeder Reinigungsschritt im Biotest überprüft (4,95,129,130). Die "zufällige" Auffindung dieses Peptids in einem Extrakt von etwa 15.000 Schweinehypophysen demonstriert die Möglichkeit, ein biologisch aktives Peptid mit relativ geringem Aufwand ohne begleitende Biotests aus biologischem Material zu isolieren, wobei die Bestimmung der biologischen Wirkungen nach der Strukturaufklärung und Synthese des Peptids erfolgen kann. Angesichts der weiteren Entwicklung analytischer und synthetischer Methoden in der Peptidchemie kann sich ein derartiges Vorgehen bei der Suche nach neuen biologisch wirksamen Peptiden in der Zukunft als äußerst nützlich erweisen.

Zusammenfassung.

Es wurde untersucht, ob bei Säugetieren Peptide vorkommen, die in Tierversuchen Verhaltensänderungen auslösen, die mit denen von klinisch wirksamen Psychostimulantien und Antidepressiva vergleichbar sind. Dabei wurde sowohl mit bekannten Neuropeptiden und Peptidanaloga als auch mit peptidhaltigen Extrakten gearbeitet. Für die Verhaltenstests wurden überwiegend Mäuse verwendet. Die Peptide wurden intracerebroventrikulär, d. h. unter Umgehung der Blut-Hirn-Schranke, appliziert. Zum Nachweis der Peptidwirkung wurde etwa 5-11 Minuten nach der Injektion ein Verhaltenstest durchgeführt. Es wurden drei verschiedene Verhaltenstests verwendet, in denen spontan auftretende Verhaltensweisen wie Lokomotion und Putzverhalten, vor allem aber Streß-induziertes Verhalten wie Immobilität und Fluchtversuche quantitativ bestimmt wurden.

In Extrakten aus Gehirn und Hypophyse von Schweinen wurden niedermolekulare Peptide nachgewiesen, die in einem Verhaltenstest wirkten, der als Screeningtest für Psychostimulantien und Antidepressiva verwendet wird. In diesem und zwei weiteren Tests, die zur näheren Charakterisierung der Wirkungen verwendet wurden, konnten nur bei Oxytocin und Vasopressin ähnliche Wirkungen festgestellt werden. Das biologisch aktive Material aus den Extrakten wurde in mehrere Komponenten aufgetrennt, die zum Teil mit den bekannten Hormonen identisch, zum Teil nicht identifiziert sind.

Andere biologisch aktive Peptide wie zum Beispiel ACTH, Angiotensin, Substanz P, Neurotensin, die hypothalamischen

Freisetzungsfaktoren und die Endorphine lösten ebenfalls Verhaltensänderungen aus. Das Spektrum dieser Verhaltensänderungen war in keinem Fall mit dem der Hinterlappenhormone und der Extrakte identisch. Das Gleiche gilt für zentralnervös wirksame Drogen wie zum Beispiel Psychostimulantien, Antidepressiva und Psychodysleptika: Nur bei einzelnen Verhaltensparametern, nicht aber beim ganzen Wirkungsspektrum waren Ähnlichkeiten mit den Verhaltenseffekten der Hinterlappenhormone nachweisbar.

Es konnte gezeigt werden, daß die Verhaltenseffekte der Hinterlappenhormone von kurzer Dauer sind und über einen zentralnervösen Mechanismus vermittelt werden. Durch die Untersuchung synthetischer Analoga ließ sich zeigen, daß bereits geringe Modifikationen im chemischen Aufbau der Peptide zu drastischen Änderungen der verhaltensändernden Potenz führen können. Die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen zeigten, daß die Verhaltensänderungen über einen Rezeptor vermittelt werden, der mit den Rezeptoren für die hormonalen Wirkungen dieser Peptide, vor allem für die blutdrucksteigernde Wirkung, nah verwandt, aber nicht identisch ist. Ein kompetitiver Antagonist der verhaltensändernden Wirkung wurde beschrieben. Die hier beschriebenen Verhaltenseffekte der Hinterlappenhormone konnten an Hand verschiedener Kriterien, wie zum Beispiel dem zeitlichen Verlauf der Wirkung, der Wirkung nach subcutaner Injektion und den Struktur-Aktivitäts-Beziehungen eindeutig gegen andere zentralnervöse Wirkungen dieser Peptide abgegrenzt werden.

Die verhaltensändernden Wirkungen der Hinterlappenhormone konnten pharmakologisch näher charakterisiert werden: Tachyphylaxie und vor allem eine erhebliche Toleranzbildung nach wiederholter Injektion wurden nachgewiesen. Der Einfluß zentralnervös wirksamer Pharmaka auf die Verhaltenseffekte

von Hinterlappenhormonen wurde untersucht. Die typischen Peptidwirkungen wurden von einigen psychotropen Drogen wie Amphetamin, MDA, Mescaline und einem Enkephalinderivat ganz oder teilweise antagonisiert.

In einer Versuchsreihe mit Ratten wurde die starke Art-spezifität der Verhaltenseffekte von Oxytocin und Vasopressin gezeigt: Zwar waren auch hier Verhaltensänderungen zu beobachten, die im gleichen Dosisbereich auftraten wie bei Mäusen, doch zeigten diese nur wenig Ähnlichkeit mit den für Mäuse typischen Wirkungen.

Literatur

1. Algeri, S., N. Brunello, G. Calderini und A. Consolazione: Effect of enkephalins on catecholamine metabolism in rat CNS. Adv. Biochem. Psychopharmacol. 18, 199-210 (1978).
2. Altura, B. M.: Significance of amino acid residues in vasopressin on contraction in vascular smooth muscle. Amer. J. Physiol. 219, 222-228 (1970).
3. Anastasi, A., V. Erspamer und M. Bucci: Isolation and structure of bombesin and alytesin, two analogous active peptides from the skin of the European amphibians Bombina and Alytes. Experientia 27, 166-167 (1971).
4. Baba, Y., H. Matsuo und A. V. Schally: Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone II. Confirmation of the proposed structure by conventional sequential analysis. Biochem. Biophys. Res. Comm. 43, 1334-1339 (1971).
5. van Beek-Verbeek, G., M. Fraenkel, P. J. Geerlings, J. M. van Ree und D. de Wied: A vasopressin analogue in methadone detoxification of heroin addicts. Lancet 738-739 (1979).
6. Berger, Ph. A.: Investigating the role of endogenous opioid peptides in psychiatric disorders. Neuroscience Res. Progr. Bull. 16, 585-597 (1978).
7. Bloom, F., D. Segal, N. Ling und R. Guillemin: Endorphins: Profound behavioral effects in rats suggest new etiological factors in mental illness. Science 196, 630-632 (1976).
8. Bohus, B.: Effects of ACTH-like neuropeptides on animal behavior and man. Pharmacology 18, 113-122 (1979).

9. Bohus, B., I. Urban, Tj. B. van Wimersma Greidanus und D. de Wied: Opposite effects of oxytocin and vasopressin on avoidance behavior and hippocampal theta rhythm in the rat. *Neuropharmacology* 17, 239-247 (1978).
10. Boissonnas, R. A. und St. Guttmann: Synthèse d'analogues de l' oxytocine et de la lysine vasopressine contenant de la phénylalanine ou de la tyrosine en positions 2 et 3. *Helv. Chim. Acta* 43, 190-193 (1960).
11. Boissonnas, R. A., St. Guttmann, B. Berde und H. Konzett: Relationship between the chemical structures and the biological properties of the posterior pituitary hormones and their synthetic analogues. *Experientia* 17, 377-390 (1961).
12. Borghi, C., Nicosia, S., Giachetti, A. und Said, S. I.: Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) stimulates adenylate cyclase in selected areas of rat brain. *Life Sciences* 24, 65-70 (1979).
13. Botos, C. R., C. W. Smith, Y.-L. Chan und R. Walter: Synthesis and biological activities of arginine-vasopressin analogues designed from a conformation-activity approach. *J. Med. Chem.* 22, 926-931 (1979).
14. Brown, M., J. Rivier und W. Vale: Bombesin: Potent effects on thermoregulation in the rat. *Science* 196: 998-1000 (1977).
15. Brown, M., R. Allen, J. Villarreal, J. Rivier und W. Vale: Bombesin-like activity: Radioimmunologic assessment in biological tissues. *Life Sci.* 23, 2721-2728 (1978).
16. Brown, M., Y. Tache und D. Fisher: Central nervous system action of bombesin: Mechanism to induce hyperglycemia. *Endocrinology* 105, 660-665 (1979).
17. Buijs, R. M.: Intra- and extrahypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. *Cell Tiss. Res.* 192, 423-435 (1978).

18. Capek, R.: Some effects of bradykinin on the central nervous system. *Biochem. Pharmacol.* 10, 61-63 (1962).
19. Carraway, R. und S. E. Leeman: The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalamus. *J. Biol. Chem.* 248, 6854-6861 (1973).
20. Chan, W. Y. und V. du Vigneaud: Comparison of the pharmacologic properties of oxytocin and its highly potent analogue, desamino-oxytocin. *Endocrinology* 71, 977-982 (1962).
21. Chan, W. Y., M. O'Connell und S. R. Poneroy: Effects of the estrous cycle on the sensitivity of rat uterus to oxytocin and desamino-oxytocin. *Endocrinology* 72, 279-282 (1963).
22. Chan-Palay, V., G. Jansson und S. L. Palay: Serotonin and Substance P coexist in neurons of the rat's central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 1582-1586 (1978).
23. Chang, M. M. und S. E. Leeman: Isolation of a sialogogic peptide from bovine hypothalamic tissue and its characterization as substance P. *J. Biol. Chem.* 245, 4784-4790 (1970).
24. Cheramy, A., A. Nieoullon, R. Michelot und J. Glowinski: Effects of intranigral application of dopamine and substance P on the in vivo release of newly synthesized ³H dopamine in the ipsilateral caudate nucleus of the cat. *Neurosci. Lett.* 4, 105-109 (1977).
25. Cohn, M. L.: Acute behavioral changes induced in the rat by the intracerebroventricular administration of thyrotropin releasing factor (TRF) and somatostatin. Society of toxicology 14th annual meeting, Williamsburg, Virginia 1975.
26. Cox, B., A. J. Kastin und H. Schnieden: A comparison between a melanocyte stimulating hormone inhibitory factor (MIF-1) and substances known to activate central dopamine receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 36, 141-147 (1976).

27. Cunha, J. M. und J. Masur: Evaluation of psychotropic drugs with a modified open field test. *Pharmacology* 16, 259-267 (1978).
28. Cusan, L., A. Dupont, G. S. Kledzik, F. Labrie, D. H. Coy und A. V. Schally: Potent prolactin and growth hormone releasing activity of more analogues of met-enkephalin. *Nature* 268, 544-547 (1977).
29. Delanoy, R. L., A. J. Dunn und R. Tintner: Behavioral responses to intracerebroventricularly administered neurohypophyseal peptides in mice. *Horm. Behav.* 11, 348-362 (1978).
30. Delanoy, R. L., A. J. Dunn und R. Walter: Neurohypophyseal hormones and behavior: Effects of intracerebroventricularly injected hormone analogs in mice. *Life Sci.* 24, 651-658 (1979).
31. Dogterom, J., Tj. B. van Wimersma Greidanus und D. F. Swaab: Evidence for the release of vasopressin and oxytocin into cerebrospinal fluid: Measurements in plasma and cerebrospinal fluid of intact and hypophysectomized rats. *Neuroendocrinology* 24, 108-118 (1977).
32. Dogterom, J., C. M. F. van Rheenen-Verberg, Tj. B. van Wimersma Greidanus und D. F. Swaab: Vasopressin and oxytocin in cerebrospinal fluid of rats. *J. Endocrinol.* 72, 74P-75P (1977).
33. Dogterom, J. und M. Buijs: Vasopressin and oxytocin distribution in rat brain: Radioimmunoassay and immunocytochemical studies. In: IBRO monograph series 7, Neuropeptides and Neural Transmission, C. A. Marsan und W. Z. Traczyk (Eds.), S. 293-300. Raven Press, New York 1980.
34. Dornbush, R. L. und O. Nikolovski: ACTH 4-10 and short-term memory. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 5, 69-72 (1976).
35. Dorsa, D. M. und J. M. van Ree: Modulation of substantia nigra self-stimulation by neuropeptides related to neurohypophyseal hormones. *Brain Res.* 172, 367-371 (1979).

36. Duffy, M. J., J. Wong und D. Powell: Stimulation of adenylate cyclase in rat and human brain by substance P. Biochem. Soc. Trans. 551st meeting 1262-1266 (1974).
37. Dutta, A. S., J. J. Gormley, C. F. Hayward, J. S. Morley, J. S. Shaw, G. J. Stacey und M. T. Turnbull: Enkephalin analogues eliciting analgesia after intravenous injection. Life Sci. 21, 559-562 (1977).
38. Dyckes, D. F., M. F. Ferger, V. du Vigneaud und W. Y. Chan: Synthesis and some of the pharmacological properties of [4-Leucine]-8-lysine-vasopressin and [1-deamino,4-leucine]-8-lysine-vasopressin. J. Med. Chem. 16, 843-847 (1973).
39. van Dyke, H. B., W. H. Sawyer und N. I. Overweg: Pharmacologic activities of the 8-citrulline analogues of oxytocin and vasopressin. Endocrinology 73, 637-639 (1963).
40. Ehrensing, R. H. und A. J. Kastin: Clinical investigations for emotional effects of neuropeptide hormones. Pharmacol. Biochem. Behav. 5, Suppl. 1, 89-93 (1976).
41. Everett, G. M.: The DOPA response potentiation test and its use in screening for antidepressant drugs. Proc. 1. Intern. Symp. on Antidepressant Drugs, Excerpta Med. Int. Congr. Ser. No. 122, Milan. 1966.
42. Fahrenkrug, J.: Vasoactive intestinal polypeptide. Trends in Neurosciences, 1980 (1), 1-2
43. Fencl, V., G. Koski und J. R. Pappenheimer: Factors in cerebrospinal fluid of goats that affect sleep and activity in rats. J. Physiol. 216, 565-589 (1971).
44. Ferrier, B. M., D. Jarvis und V. du Vigneaud: Deamino oxytocin. Its isolation by partition chromatography on sephadex and crystallization from water, and its biological activities. J. Biol. Chem. 240, 4264-4266 (1965).

45. Fitzsimons, J. T. und Evered, M. D.: Eledoisin, substance P and related peptides: Intracranial dipsogens in the pigeon and antidipsogens in the rat. *Brain Res.* 150, 533-542 (1978).
46. Flexner, J. B., L. B. Flexner, P. L. Hoffmann und R. Walter: Dose-response relationships in attenuation of puromycin-induced amnesia by neurohypophyseal peptides. *Brain Res.* 134, 139-144 (1977).
47. Flood, J. F., M. E. Jarvik, E. L. Bennett und A. E. Orme: Effects of ACTH peptide fragments on memory formation. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 5, Suppl. 1, 41-51 (1976).
48. Flouret, G. und V. du Vigneaud: The synthesis and some pharmacological activities of [4-L-norvaline]-oxytocin and [4-L-norleucine]-oxytocin and their deamino analogs. *J. Med. Chem.* 12, 1035-1038 (1969).
49. Gauldie, J., J. M. Hanson, F. D. Rumjanek, R. A. Shipolini und Ch. A. Vernon: The peptide components of bee venom. *Eur. J. Biochem.* 61, 369-376 (1976).
50. GillesSEN, D. und V. du Vigneaud: The synthesis and pharmacological properties of 4-decarboxamido-8-lysin-vasopressin, 5-decarboxamido-8-lysin-vasopressin, and their 1-deamino analogues. *J. Biol. Chem.* 242, 4806-4812 (1967).
51. GillesSEN, D. und V. du Vigneaud: Synthesis and pharmacological properties of 4-decarboxamido-8-arginine-vasopressin and its 1-deamino analog. *J. Med. Chem.* 13, 346-349 (1970).
52. Gispen, W. H., V. M. Wiegant, A. F. Bradbury, E. C. Hulme, D. G. Smith, C. R. Snell und D. de Wied: Induction of excessive grooming in the rat by fragments of lipotropin. *Nature* 264, 794-795 (1976).

53. Gitelman, H. J., D. G. Klapper, F. R. Alderman und W. B. Blythe: Ala-gly- and val-asp- arg⁸ -vasopressin: Bovine storage forms of arginine vasopressin with natriuretic activity. *Science* 207, 893-896 (1980).
54. Gold, Ph. W., F. K. Goodwin und V. I. Reus: Vasopressin in affective illness. *Lancet*, 1233-1235 (1978).
55. Greenberg, R., C. E. Whalley, F. Jourdikian, I. S. Mendelson, R. Walter, K. Nikolics, D. H. Coy, A. V. Schally und A. J. Kastin: Peptides readily penetrate the blood-brain barrier: Uptake of peptides by synaptosomes is passive. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 5, Suppl. 1, 151-158 (1976).
56. Gunne, L. A., L. Lindström und E. Widerlöv: Possible role of endorphins in schizophrenia and other psychiatric disorders. In: *Endorphins in Mental Health Research*, E. Usdin, W. E. Bunney Jr. und N. S. Kline (Eds), S. 547-552.
57. Guttmann, St.: Synthèse de la Sér⁴-ile⁸-oxytocine, une éventuelle hormone hypophysaire de certains poissons (isotocine). *Helv. Chim. Acta* 45, 2622-2624 (1962).
58. Habermann, E.: Bee and Wasp Venoms. *Science* 177, 314-322 (1972).
59. Haley, T. J. und W. G. McCormick: Pharmacological effects produced by intracerebral injection of drugs in the conscious mouse. *Brit. J. Pharmacol.* 12, 12-15 (1957).
60. Havran, R. T. und V. du Vigneaud: The synthesis and pharmacological properties of [2-isoleucine]-8-lysine-vasopressin and its 1-deamino analog. *J. Amer. Chem. Soc.* 91, 3626-3628 (1969).
61. Hawthorn, J., V. T. Y. Ang und J. S. Jenkins: Localization of vasopressin in the rat brain. *Brain Res.* 197, 75-81 (1980).

62. Herbst, T. J., M. E. Raichle und J. A. Ferrendelli: β -adrenergic regulation of adenosine 3',5'-monophosphate concentration in brain microvessels. *Science* 204, 330-332 (1979).
63. Hoffman, P. L., R. F. Ritzmann, R. Walter und B. Tabakoff: Arginine vasopressin maintains ethanol tolerance. *Nature* 276, 614-616 (1978).
64. Hoffman, P. L., R. F. Ritzmann und B. Tabakoff: The influence of arginine vasopressin and oxytocin on ethanol dependence and tolerance. *Curr. Alcohol.* 5, 5-16 (1978).
65. Holaday, J. W., H. H. Loh und C. H. Li: Unique behavioral effects of β -endorphin and their relationship to thermoregulation and hypothalamic function. *Life Sci.* 22, 1525-1536 (1978).
66. Hong, J.-S., H.-Y. Y. Yang, G. Racagny und E. Costa: Projections of substance P-containing neurons from neostriatum to substantia nigra. *Brain Res.* 122, 541-544 (1977).
67. Hostetter, G., S. L. Jubb und G. P. Kozlowski: An inability of subcutaneous vasopressin to affect passive avoidance behavior. *Neuroendocrinology* 30, 174-177 (1980).
68. Huideboto-Toro, J. P., A. Scotti de Carolis und V. G. Longo: Action of two hypothalamic factors (TRH, MIF) and of angiotensin II on the behavioral effects of L-DOPA and 5-hydroxytryptophan in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2, 105-109 (1974).
69. Huideboto-Toro, J. P., A. Scotti de Carolis und V. G. Longo: Intensification of central catecholaminergic and serotonergic processes by the hypothalamic factors MIF and TRH and by angiotensin II. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 3, 235-242 (1975).
70. Jacquet, Y. F.: Opiate effects after adrenocorticotropin or β -endorphin injection in the periaqueductal gray matter of rats. *Science* 201, 1032-1034 (1978).

71. Janowsky, D., L. Judd, L. Huey, N. Roitman, D. Parker und D. Segal: Naloxone effects on manic symptoms and growth hormone levels. *Lancet*, 320-321 (1978).
72. Jones, D. A. Jr. und W. H. Sawyer: N-acetyl-[2-(O-methyl) tyrosine] arginine-vasopressin, an interesting antagonist of the vasopressor response to vasopressin. *J. Med. Chem.* 23, 696-698 (1980).
73. Kanazawa, I. und T. Jessell: Postmortem changes and regional distribution of substance P in the rat and mouse nervous system. *Brain Res.* 117, 362-367 (1976).
74. Kastin, A. J., C. Nissen, A. V. Schally und D. H. Coy: Blood-brain barrier, half-time disappearance, and brain distribution for labeled enkephalin and a potent analog. *Brain Res. Bull.* 1, 583-589 (1976).
75. Kastin, A. J., E. L. Scollan, R. H. Ehrensing, A. V. Schally und D. H. Coy: Enkephalin and other peptides reduce passiveness. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 9, 515-519 (1978).
76. Kastin, A. J., R. D. Olson, A. V. Schally und D. H. Coy: CNS effects of peripherally applied brain peptides. *Life Sci.* 25, 401-414 (1979).
77. Katz, R. J.: Substance P elicited grooming in the mouse: Behavioral and pharmacological characteristics. *Intern. J. Neuroscience* 10, 187-189 (1980).
78. Katz, R. J.: Grooming elicited by intracerebroventricular bombesin and eledoisin in the mouse. *Neuropharmacology* 19, 143-146 (1980).
79. Katz, R. J.: Behavioral effects of dynorphin - a novel opioid neuropeptide. *Neuropharmacology* 19, 801-803 (1980).
80. Katz, R. J. und J. Gelbaut: Endogenous opiates and behavioral responses to environmental novelty. *Behav. Biol.* 24, 338-348 (1979).

81. Kelley, A. E. und S. D. Iversen: Behavioral response to bilateral injections of substance P into the substantia nigra of the rat. Brain Res. 158, 474-478 (1978).
82. Kimbrough, R. D. Jr., W. D. Cash, L. A. Branda, W. Y. Chan und V. du Vigneaud: Synthesis and biological properties of 1-deamino-8-lysine vasopressin. J. Biol. Chem. 238, 1411-1414 (1963).
83. Konishi, S. und M. Otsuka: The effects of substance P and other peptides on spinal neurons of the frog. Brain Res. 65, 397-410 (1974).
84. Kovács, G. L., B. Bohus und D. H. G. Versteeg: The effects of vasopressin on memory processes: The role of noradrenergic neurotransmission. Neuroscience 4, 1529-1537 (1979).
85. Kovács, G. L., B. Bohus, D. H. G. Versteeg, E. R. de Kloet und D. de Wied: Effect of oxytocin and vasopressin on memory consolidation: Sites of action and catecholaminergic correlates after local microinjection into limbic midbrain structures. Brain Res. 175, 303-314 (1979).
86. Kruse, H., Tj. B. van Wimersma Greidanus und D. de Wied: Barrel rotation induced by vasopressin and related peptides in the rat. Pharmacol. Biochem. Behav. 7, 311-313 (1977).
87. Landgraf, R., A. Ermisch und J. Heß: Indications for a brain uptake of labelled vasopressin and oxytocin and the problem of the blood-brain barrier. Endokrinologie 73, 77-81 (1979).
88. Leaf, A. und C. H. Coggins: The neurohypophysis. In: Textbook of Endocrinology, R. H. Williams (Ed.), 80-94. Saunders Comp., Philadelphia, London, Toronto 1974.
89. Leeman, S. E. und E. A. Mroz: Substance P. Life Sci. 15, 2033-2044 (1975).

90. Legros, J. J., P. Gilot, X. Seron, J. Claessens, A. Adam, J. M. Moeglen, A. Audibert und P. Berchier: Influence of vasopressin on learning and memory. *Lancet* 41-42 (1978).
91. Liebeskind, J. C.: Do the brain's own endorphins mediate pain inhibition? *Neurosciences Res. Progr. Bull.* 16, 574-579 (1978).
92. Loh, H. H., L. F. Tseng, E. Wei und C. H. Li: β -endorphin is a potent analgesic agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 2895-2898 (1976).
93. Magnusson, T., A. Carlsson, G. H. Fisher, D. Chang und K. Folkers: Effect of synthetic substance P on monoaminergic mechanisms in the brain. *J. Neur. Transm.* 38, 89-93 (1976).
94. Marks, N.: Conversion and inactivation of neuropeptides. In: *Peptides in Neurobiology*, H. Gainer (Ed.), 221-258. Plenum Press, New York 1977.
95. Matsuo, H., Y. Baba, R. M. G. Nair, A. Arimura und A. V. Schally: Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone I. The proposed amino acid sequence. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 43, 1334-1339 (1971).
96. Meglio, M., Y. Hosobuchi, H. H. Loh, J. E. Adams und Ch. H. Li: β -endorphin: Behavioral and analgesic activity in cats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 774-776 (1977).
97. Meienhofer, J. und V. du Vigneaud: Synthesis of a biologically active analog of lysine vasopressin, with phenylalanine replacing tyrosine: [2-phenylalanine]lysine-vasopressin. *J. Amer. Chem. Soc.* 82, 6336-6337 (1960).
98. Meienhofer, J., A. Trzeciak, R. T. Havran und R. Walter: A solid phase synthesis of [8-arginine]-vasopressin through a crystalline protected nonapeptide intermediate and biological properties of the hormone. *J. Amer. Chem. Soc.* 92, 7199-7202 (1970).

99. Miller, L. H., L. C. Harvis, H. van Riezen und A. J. Kastin: Neuroheptapeptide influence on attention and memory in man. Pharmacol. Biochem. Behav. 5, 17-21 (1976).
100. Naranjo, C.: The Healing Journey. Pantheon Books, New York 1975.
101. Nemeroff, Ch. B. und A. J. Prange Jr.: Peptides and psycho-neuroendocrinology. Arch. Gen. Psychiatry 35, 999-1010 (1978).
102. Nemeroff, Ch. B., A. J. Osbahr III, P. J. Manberg, G. N. Ervin und A. J. Prange Jr.: Alterations in nociception and body temperature after intracisternal administration of neurotensin, β -endorphin, other endogenous peptides, and morphine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 5368 - 5371 (1979).
103. Nemeroff, Ch. B., D. Luttinger und A. J. Prange Jr.: Neurotensin: Central nervous system effects of a neuropeptide. Trends in Neurosciences, 1980, 212-215.
104. Ogata, N.: Effects of substance P on neurons of various brain regions in vitro. Brain Res. 176, 395-400 (1979).
105. Oldendorf, W. H.: Brain uptake of radiolabeled amino acids, amines, and hexoses after arterial injection. Amer. J. Physiol. 221, 1629-1639 (1971).
106. Oldendorf, W. H.: Lipid solubility and drug penetration of the blood-brain barrier. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 147, 813-816 (1974).
107. Oldendorf, W. H., S. Hyman, L. Braun und S. Z. Oldendorf: Blood-brain barrier: Penetration of morphine, codeine, heroin, and methadone after carotid injection. Science 178, 984-986 (1972).
108. Oliveros, J. C., M. K. Jandali, M. Timsit-Beuthier, R. Remy, A. Benghezal, A. Audibert und J. M. Moeglen: Vasopressin in amnesia. Lancet 42 (1978).

109. Otsuka, M., S. Konishi und T. Takahashi: Hypothalamic Substance P as a candidate for transmitter of primary afferent neurons. Fed. Proc. Amer. Soc. Exp. Biol. 34, 1922-1928 (1975).
110. Pappenheimer, J. R., V. Fencf, M. L. Karnovsky und G. Koski: Peptides in cerebrospinal fluid and their relation to sleep and activity. In: Brain Dysfunction in Metabolic Disorders, F. Plum (Ed.), Bd. 53. Raven Press, New York 1974.
111. Pert, C. B., A. Pert, J.-K. Chang und B. T. W. Fong: [D-ala²] - met-enkephalinamide: A potent, long-lasting synthetic pentapeptide analgesic. Science 190, 330-332 (1976).
112. Phillis, J. W. und J. J. Limachev: Substance P excitation of cerebral cortical Betz cells. Brain Res. 69, 158-163 (1974).
113. Pinnock, R. D., M. J. Turnbull und G. N. Woodruff: Effects of peptides on neurones in the substantia nigra and nucleus accumbens. Brit. J. Physiol. 67, 429P (1979).
114. Pittman, Q. J., Y. Taché und M. R. Brown: Bombesin acts in preoptic area to produce hypothermia in rats. Life Sci. 26, 725-730 (1980).
115. Plotnikoff, N. P., F. N. Minard und A. J. Kastin: DOPA potentiation in ablated animals and brain levels of biogenic amines in intact animals after prolyl-leucyl-glycinamide. Neuroendocrinology 14, 271-279 (1974).
116. Porsolt, R. D., A. Bertin und M. Jalfre: Behavioural despair in mice: A primary screening test for antidepressants. Arch Intern. Pharmacodyn. 229, 327-336 (1977).
117. Porsolt, R. D., A. Bertin und M. Jalfre: "Behavioural despair" in rats and mice: Strain differences and the effects of imipramine. Eur. J. Pharmacol. 51, 291-294 (1978).

118. Prange, A. J., Ch. B. Nemeroff, M. A. Lipton, G. R. Breese und J. C. Wilson: Peptides and the central nervous system. In: Handbook of Psychopharmacology, L. L. Iversen, S. D. Iversen und S. H. Snyder (Eds.), Bd. 13, S. 31-107. Plenum Press, New York 1978.
119. Quik, M., L. L. Iversen und S. R. Bloom: Effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) and other peptides on cAMP accumulation in rat brain. Biochem. Pharmacol. 27, 2209-2213 (1979).
120. Raichle, M. E. und R. L. Grubb Jr.: Regulation of brain water permeability by centrally-released vasopressin. Brain Res. 143, 191-194 (1978).
121. Raskind, M., H. Orenstein und R. E. Weitzmann: Vasopressin in depression. Lancet 164 (1979).
122. van Ree, J. M. und D. de Wied: Heroin self-administration is under the control of vasopressin. Life Sci. 21, 315-320 (1977).
123. Rehfeld, J. F.: Cholecystokinin. Trends in Neurosciences 1980, 65-67.
124. Renaud, L. P., J. B. Martin und P. Brazeau: Hypothalamic releasing factors: Physiological evidence for a regulatory action on central neurons and pathways for their distribution in brain. Pharmacol. Biochem. Behav. 5, Suppl. 1, 171-178 (1976).
125. Ritzmann, R. F., R. Walter, H. N. Bhargava und W. Krivoy: The inhibition of the development of tolerance to and physical dependence on morphine by peptides. In: IBRO monograph series 7, Neuropeptides and Neural Transmission, C. A. Marsan und W. Z. Traczyk (Eds.), S. 237-244. Raven Press, New York 1980.

126. Roemer, D., H. H. Buescher, R. C. Hill, J. Pless, W. Bauer, F. Cardinaux, A. Closse, D. Hauser und R. Huguenin: A synthetic enkephalin analogue with prolonged parenteral and oral analgesic activity. *Nature* 268, 547-549 (1977).
127. Rondeau, D. B., F. B. Jolicoeur, F. Belanger und A. Barbeau: Motor activity induced by substance P in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 9, 769-775 (1978).
128. Sandman, C. A., J. George, B. B. Walker, J. D. Nolan und A. J. Kastin: Neuropeptide ACTH/MSH 4-10 enhances attention in the mentally retarded. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 5, 23-28 (1976).
129. Schally, A. V., A. Arimura, Y. Baba, R. M. G. Nair, H. Matsuo, T. W. Redding, L. Debeljuk und W. F. White: Isolation and properties of the FSH- and LH-releasing hormone. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 43, 393-399 (1971).
130. Schally, A. V.: Aspects of hypothalamic regulation of the pituitary gland. *Science* 202, 18-28 (1978).
131. Scherschlicht, R., E. P. Bonetti und C. C. Toh: Effects of intracerebroventricularly injected "nerveside" on free behavior and EEG activity of rats. A pilot study. *Arch. Intern. Pharmacodyn.* 239, 221-229 (1979).
132. Schulz, H., G. L. Kovács und G. Telegdy: The action of vasopressin and oxytocin on the nigro-striatal dopaminergic system. In: IBRO monograph series 7, Neuropeptides and Neural Transmission, C. A. Marsan und W. Z. Traczyk (Eds.), S. 343-350. Raven Press, New York 1980.
133. Schwarzberg, H., G. Hartmann, G. L. Kovács und G. Telegdy: Effects of intraventricular oxytocin and vasopressin on self-stimulation in rats. *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* 47, 127-131 (1976).

134. Schwarzberg, H., K. Betschen, H. Unger und H. Schulz:
Beeinflussung der hypothalamischen Selbststimulation durch
intrazerebroventrikulär verabreichtes Vasopressin und
Oxytozin. *Acta Biol. Med. Germ.* 37, 1295-1296 (1978).
135. Schwarzberg, H., K. Betschen und H. Unger: Action of
neuropeptides on self-stimulation behavior in rats. In:
IBRO monograph series 7, Neuropeptides and Neural Trans-
mission, C. A. Marsan und W. Z. Traczyk (Eds.), S. 339-342.
Raven Press, New York 1980.
136. Smith, C. W., R. Walter, G. Stavropoulos und D. Theodoro-
poulos: [5-(N⁴,N⁴-dimethylasparagine),8-lysine]vasopressin:
The first 5-position neurohypophyseal hormone analogue to
retain significant antidiuretic potency. *J. Med. Chem.* 23,
217-219 (1980).
137. Sofroniew, M. V. und A. Weindl: Extrahypothalamic neuro-
physin-containing perikarya, fiber pathways and fiber clusters
in the rat brain. *Endocrinology* 102, 334-337 (1978).
138. Soloway, A. H.: Correlation of drug penetration of brain
and chemical structure. *Science* 128, 1572-1574 (1958).
139. Stahl, G. L., C. W. Smith, R. Walter, T. Tseganidis, G.
Stavropoulos, P. Cordopatis und D. Theodoropoulos: Oxytocin
and lysine-vasopressin with N⁵,N⁵-dialkylamine in the 4
position: Effect of introducing sterically hindered groups
into the hydrophilic cluster of neurohypophyseal hormones.
J. Med. Chem. 23, 213-217 (1980).
140. Stein, L. und J. D. Belluzzi: Brain endorphins: Possible
role in reward and memory formation. *Fed. Proc.* 38,
2468-2476 (1979).
141. Stinus, L., A. E. Kelley und S. D. Iversen: Increased spon-
taneous activity following substance P infusion into A 10
dopaminergic area. *Nature* 276, 616-618 (1979).

142. Summy-Long, J. Y., L. C. Keil und W. B. Severs: Identification of vasopressin in the subfornical organ region: Effects of dehydration. *Brain Res.* 140, 241-250 (1978).
143. Swanson, L. W.: Immunohistochemical evidence for a neurophysin-containing autonomic pathway arising in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Res.* 128, 346-353 (1977).
144. Taché, Y., M. Brown und R. Collu: Effects of neuropeptides on adenohipophyseal hormone response to acute stress in male rats. *Endocrinology* 105, 220-224 (1979).
145. Takahashi, T., S. Konishi, D. Powell, S. Leeman und M. Otsuka: Identification of the motoneurons depolarizing peptide in bovine dorsal root as hypothalamic substance P. *Brain Res.* 73, 59-69 (1974).
146. Takashima, H., W. Fraefel und V. du Vigneaud: The synthesis and certain pharmacological properties of deamino oxytocinoic acid methylamide and deamino oxytocinoic acid dimethylamide. *J. Amer. Chem. Soc.* 91, 6182-6185 (1969).
147. Telegdy, G. und G. L. Kovács: Role of monoamines in mediating the action of hormones on learning and memory. In: *Brain Mechanisms in Memory and Learning: From the Single Neuron to Man*. M. A. B. Brazier (Ed.). Raven Press, New York 1979.
148. Trygstad, O. E., K. L. Reichelt, I. Foss, P. D. Edminson, G. Saelid, J. Bremer, K. Hole, H. Örbeck, J. H. Johansen, J. B. Böler, K. Titlestad und P. K. Opstad: Patterns of peptides and protein-associated peptide complexes in psychiatric disorders. *Brit. J. Psychiat.* 136, 59-72 (1980).
149. Tseng, L.-F., H. H. Loh und C. H. Li: Human β -endorphin: Development of tolerance and behavioral activity in rats. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 76, 390-396 (1977).

159. Walter, R., P. L. Hoffman, J. B. Flexner und L. B. Flexner: Neurohypophyseal hormones, analogs and fragments: Their effect on puromycin-induced amnesia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 4180-4184 (1975).
160. Walter, R., C. W. Smith, J. Roy und A. Formento: Oxytocin analogues with combined high smooth muscle and negligible antidiuretic activities. Investigation of position 7 in neurohypophyseal hormones. J. Med. Chem. 19, 822-825 (1976).
161. Walter, R., G. L. Stahl, T. Caplaneris, P. Cordopatis und D. Theodoropoulos: Active-site studies of neurohypophyseal hormones: Synthesis and pharmacological properties of [5-(N⁴,N⁴-dimethylasparagine)] oxytocin. J. Med. Chem. 22, 890-893 (1979).
162. Weindl, A. und M. V. Sofroniew: Demonstration of extrahypothalamic peptide secreting neurons. A morphologic contribution to the investigation of psychotropic effects of neurohormones. Pharmakopsych. 9, 226-234 (1976).
163. de Wied, D.: Long-term effect of vasopressin on the maintenance of a conditioned avoidance response in rats. Nature 232, 58-60 (1971).
164. de Wied, D.: Behavioral effects of intraventricularly administered vasopressin and vasopressin fragments. Life Sci. 19, 685-690 (1976).
165. de Wied, D.: Peptides and behavior. Life Sci. 20, 195-204 (1977).
166. de Wied, D., D. Sarantakis und B. Weinstein: Behavioral evaluation of peptides related to scotophobin. Neuropharmacology 12, 1109-1115 (1973).
167. de Wied, D., B. Bohus und Tj. B. van Wimersma Greidanus: Memory deficit in rats with hereditary diabetes insipidus. Brain Res. 85, 152-155 (1975).

168. Wiegant, V. M., A. R. Cools und W. H. Gispen: ACTH-induced excessive grooming involves brain dopamine. Eur. J. Pharmacol. 41, 343-345 (1977).
169. van Wimersma Greidanus, Tj. B., J. Dogterom und D. de Wied: Intraventricular administration of anti-vasopressin serum inhibits memory consolidation in rats. Life Sci. 16, 637-644 (1975).
170. van Wimersma Greidanus, Tj. B., J. M. van Ree und D. H. G. Versteeg: Neurohypophyseal hormones and avoidance behavior: The involvement of vasopressin and oxytocin in memory processes. In: IBRO monograph series 7, Neuropeptides and Neural Transmission, C. A. Marsan und W. Z. Traczyk (Eds.), S. 293-300. Raven Press, New York 1980.
171. Wojcik, M. und S. Niemierko: The effect of synthetic scotophobin on motor activity in mice. Acta Neurobiol. Exp. 38, 25-30 (1978).
172. Yamashiro, D., L.-f. Tseng und Ch. H. Li: [D-Thr²,thz⁵]- and [D-Met²,thz⁵]-enkephalinamides: Potent analgesics by intravenous injection. Biochem. Biophys. Res. Comm. 78, 1124-1129 (1977).

